LÚCIA REGINA CANGUSSU DA SILVA

EFEITOS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DE *Gigaspora gigantea* in vitro.

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do grau de "MESTRE".

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS - MINAS GERAIS

1990

EFEITOS DE COMPOSTOS ORGANICOS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DE **Gigaspora gigantea** *in vitro*

APROVADA:

Prof. José Oswaldo Siqueira

Prof. Hilário Antônio de Castro

Pesq. Elizabeth de Oliveira

Pesq. Arnaldo Colozzi Filho

À memória de meus pais,

Ademar Pinheiro Cangussu e

Maria Conceição da Silva.

HOMENAGEM

À minha família e

ao meu noivo, Sérgio.

DEDICO

"As usual, our past discoveries often pose more questions than answers." (Powell & Bagyaraj)

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura de Lavras e ao Departamento de Ciência do Solo, pelo apoio e inúmeras oportunidades de aprendizagem proporcionadas.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e ao Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT) e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo financiamento da pesquisa.

Ao professor José Oswaldo Siqueira pela oportunidade de realização deste estudo e pela orientação.

À Elizabeth de Oliveira pela amizade, apoio e orientação.

Ao professor Rubens Delly Veiga pela amizade e orientação nas análises estatísticas.

Ao laboratorista Manoel Aparecido da Silva, pelo carinho e apoio incansáveis.

À Maria Helena de Freitas pela amizade, apoio e companheirismo nas horas mais difíceis.

Às companheiras de república, Luiza Del Carmen Barrett Reina e Rosângela Maria Neves Bezerra por deixarem em mim um pouco de tudo de bom que possuem.

Às estagiárias Joelma Pereira, Islaine Calixto Azevedo e Maria Geralda Vilela Rodrigues pelo carinho e dedicação dispensados.

Aos colegas e amigos que compartilharam este tempo comigo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste estudo, meus agradecimentos sinceros.

BIOGRAFIA DA AUTORA

LUCIA REGINA CANGUSSU DA SILVA, filha de Ademar Pinheiro Cangussu e Maria Conceição da Silva, natural de Vila Pereira, estado de Minas Gerais, nascida aos 02 de agosto de 1961.

Ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais em agosto de 1981. Em janeiro de 1985, iniciou o curso de Bacharelado em Microbiologia, graduando-se em dezembro de 1986.

Em fevereiro de 1987, iniciou o curso de pós-graduação em Agronomia, área de concentração Solos e Nutrição de Plantas, sub-área Microbiologia do Solo, na Escola Superior de Agricultura de Lavras, concluindo-o em fevereiro de 1990.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE QUADROS

LISTA DE FIGURAS

Figura

Página

1. INTRODUÇÃO

Os estudos pioneiros sobre as associações micorrízicas do tipo vesículo-arbuscular (MVA) datam do século passado. Desde então, o número de estudos sobre estas associações avoluma-se a cada ano. Este grande interesse se justifica pelos efeitos benéficos que as MVA proporcionam à nutrição mineral e ao desenvolvimento da planta hospedeira.

Apesar do grande volume de informações atualmente disponíveis sobre o estabelecimento e funcionamento dessas associações, o seu emprego em larga escala é ainda restrito devido às dificuldades encontradas na produção de inóculo, pois os fungos MVA são simbiontes obrigatórios e ainda não foram cultivados em meios de cultura no laboratório. Inóculo tem sido produzido em vasos de cultivo contendo substratos desinfestados ou em sistemas hidropônicos, contendo a planta hospedeira e uma ou mais espécies de fungos MVA.

O inóculo assim obtido não é adequado à comercialização, devido às dificuldades encontradas no controle de suas

características fisiológicas e microbiológicas e de sua eficácia como produto comercial. Estas exigências serão satisfatoriamente preenchidas com o desenvolvimento de técnicas de cultivo axênico de fungos MVA, as quais possibilitarão a produção em massa de inóculo de qualidade seguramente controlada e se constituirão em sistemas apropriados para estudos visando a caracterização morfológica, bioquímica e taxonômica destes organismos, além de facilitar estudos direcionados para a seleção de fungos com maior efetividade simbiótica e maior adaptabilidade a condições edafoclimáticas específicas.

Neste sentido, os estudos de nutrição que buscam a obtenção de fontes adequadas de nutrientes orgânicos, inorgânicos e de cofatores que possibilitem o crescimento micelial em massa de fungos MVA *in vitro* são de grande relevância. Assim, conduziu-se o presente estudo com o objetivo de caracterizar o crescimento micelial do fungo MVA Gigaspora gigantea, estabelecer sua curva de crescimento e determinar os efeitos de carboidratos e de ácidos orgânicos sobre seu crescimento micelial *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais das associações micorrízicas vesículo-arbusculares (MVA)

As associações MVA constituem, provavelmente, a relação planta-fungo mais comumente encontrada na natureza. Portanto, podemos considerar a maioria dos vegetais como organismos dualistas, pois seus órgãos de absorção de água e de nutrientes são constituídos pelas raízes e pelas estruturas do fungo, GERDEMANN (1968).

Os fungos envolvidos nestas associações pertencem aos Zygomycetos, família Endogonaceae, a qual inclui os gêneros Gigaspora, Scutellospora, Acaulospora, Glomus, Sclerocystis e Entrophospora, SIQUEIRA *et alii* (1985) e WALKER & SANDERS (1986). As hifas fúngicas penetram o córtex das raízes hospedeiras formando arbúsculos (estruturas ramificadas dicotomicamente) no interior das células corticais e vesículas (estruturas ovóides ricas em lípidios) nas hifas inter e intracelulares. As estruturas intraradiculares encontram-se em comunicação direta com o meio externo através do micélio extraradicular que se espalha e se ramifica intensamente no solo constituindo-se na base para a absorção de nutrientes minerais, GERDEMANN (1968);

MOSSE (1973) e SIQUEIRA (1986).

A resposta em crescimento das plantas micorrizadas, frequentemente observada após colonização do sistema radicular, resulta primariamente da alta eficiência do micélio extraradicular em absorver nutrientes da solução do solo, especialmente aqueles de baixa mobilidade como o fósforo, o zinco e o cobre. Esses nutrientes são translocados até o micélio intraradicular e transferidos ao hospedeiro através dos arbúsculos, MOSSE (1973). Além da maior absorção de nutrientes, a planta hospedeira pode beneficiar-se da simbiose pela melhor absorção de água do solo, maior resistência a patógenos radiculares e melhor nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio em leguminosas, LOPES *et alii* (1983).

Diversos fatores físicos, químicos e biológicos do solo atuam sobre o estabelecimento e funcionamento das associações MVA e contribuem de forma significativa para a imprevisibilidade dos resultados obtidos com a inoculação. Dentre estes fatores destacam-se a disponibilidade de água, a taxa de O_2, a temperatura, a taxa de luminosidade, a disponibilidade de nutrientes orgânicos e inorgânicos, o pH, hormônios e exsudatos de plantas e de microrganismos, predação de hifas por nematóides micófagos e hiperparasitismo de esporos, SIQUEIRA (1986).

A maioria dos estudos revela o caráter benéfico destas associações para o desenvolvimento da planta hospedeira, sendo raros os relatos de efeitos negativos da inoculação, BUWALDA & GOH (1982). Entretanto,estudos com fungos MVA são geralmente

conduzidos em condições controladas e em substratos desinfestados e não refletem o potencial real de aplicação destes fungos. Estudos a nível de campo são dificultados pela inexistência de inóculo de boa qualidade e em quantidade suficiente, pois apesar dos inúmeros esforços já realizados, não foi ainda desenvolvido um meio nutritivo que permita a produção extensiva de micélio e a esporulação destes fungos axenicamente, HEPPER (1984b).

2.2. Fisiologia e bioquímica de fungos MVA

Três linhas básicas de estudo têm sido adotadas na tentativa de elucidação da fisiologia e bioquímica de fungos MVA. A primeira se baseia no fornecimento de compostos marcados à planta hospedeira e determinação de sua incorporação ao tecido fúngico. Este enfoque experimental fornece evidências indiretas da capacidade do fungo em absorver e metabolizar compostos orgânicos. A segunda busca determinar os efeitos diretos de diferentes compostos e meios nutritivos sobre a germinação e crescimento micelial *in vitro*, visando principalmente a obtenção de fontes de carbono e de nutrientes inorgânicos capazes de sustentar o crescimento micelial na ausência de raízes vivas. A terceira linha de estudos utilizada busca estabelecer as vias metabólicas operantes em esporos ou em micélio vegetativo através da utilização de precursores marcados, de inibidores metabólicos e de técnicas citoquímicas. Alguns aspectos desses

estudos serão considerados a seguir.

2.2.1. Fisiologia de fungos MVA *in vivo*

Os estudos de fisiologia das associações MVA *in vivo* são recentes e pouco numerosos e buscam basicamente determinar os compostos orgânicos fornecidos aos fungos MVA pelas plantas hospedeiras e identificar as vias metabólicas operantes na metabolização e incorporação do carbono absorvido ao tecido fúngico intra e extraradicular.

Os estudos de morfologia e citoquímica das associações MVA fornecem inúmeras evidências de que as estruturas fúngicas nas raízes constituem um dreno de fotossintatos da planta hospedeira. Dentre estas destacam-se as observações de que: (a) as estruturas fúngicas ocupam cerca de 43% do volume radicular e 10% da área celular, COX & TINKER (1976) e READ & STRIBLEY (1975), (b) a produção de micélio e esporos extraradiculares é extensiva, READ (1987),(c) glóbulos de lipídios são abundantes nas hifas intra e extraradiculares, nos esporos e nas vesículas do fungo, COX *et alii* (1975), COOPER & LÖSEL (1978) e JABAJI-HARE (1984, 1986), (d) células hospedeiras não apresentam grânulos de amido no citoplasma, GIANINAZZI-PEARSON *et alii* (1981) e NEMEC (1981) e (e) raízes micorrizadas apresentam maiores teores de açúcares solúveis, HAYMAN (1974) e THOMSON *et alii* (1986). Os relatos de que cerca de 6 a 10% dos fotossintatos enviados para as raízes é consumido em atividades relacionadas

ao estado micotrófico corroboram com a hipótese de que os fungos MVA constituem um dreno de carbono da planta hospedeira, KOCH & JOHNSON (1984). Para tanto, os fungos MVA devem necessariamente possuir a capacidade de absorver e metabolizar os compostos orgânicos fornecidos pelo hospedeiro, COX *et alii* (1975) e COOPER & LÖSEL (1978).

A forma na qual o carbono é transferido para o fungo é ainda desconhecida, mas o desaparecimento de amido de células infectadas sugere que a sacarose, molécula precursora do amido, é provavelmente a forma de carbono disponível para o fungo, GIANINAZZI-PEARSON *et alii* (1981) e NEMEC (1981). Uma outra possibilidade é de que os fungos MVA utilizem polissacarídeos precursores da síntese de parede da célula hospedeira, GIANINAZZI *et alii* (1983). No entanto, arabinose, um importante componente da parede celular de células vegetais, exerce efeito inibitório sobre o crescimento micelial de fungos MVA *in vitro*, mesmo quando fornecido em baixas concentrações, SIQUEIRA & HUBBELL (1986).

Compostos marcados com ^{14}C têm sido empregados em vários estudos *in vivo* para determinar a permeabilidade e capacidade de metabolização de compostos orgânicos pelo micélio intraradicular. A comprovação da permeabilidade das hifas fúngicas a compostos orgânicos resultantes da fotossíntese foi relatada por COX *et alii* (1975), os quais demonstraram a presença de ^{14}C em todas as estruturas intra e extraradiculares do fungo, inclusive nos esporos. Ao contrário do que ocorre em

fungos ectomicorrízicos, o carbono absorvido não é convertido em trealose ou manitol, BEVEGE *et alii* (1975). A presença de abundantes glóbulos de lipídios nos fungos MVA parece indicar que a síntese de lipídios constitui a forma principal de mobilização do carbono originado do hospedeiro. A manutenção do fluxo de carbono parece ser conseguida através da degradação e utilização dos lipídios de reserva no processo de elongação das hifas mais jovens, COX *et alii* (1975) e COOPER & LÖSEL (1978).A observação de que raízes micorrizadas apresentam concentrações mais elevadas de lipídios que raízes não micorrizadas corrobora com esta hipótese, PACOVSKY & FULLER (1988) e COOPER & LÖSEL (1978).

A análise das frações marcadas com ^{14}C, fornecido como $^{14}CO_2$ à planta hospedeira, revela que cerca de 49% do carbono absorvido é prontamente incorporado em lipídios, 31% em ácidos orgânicos e aminoácidos e apenas 15% em carboidratos solúveis, BEVEGE *et alii* (1975). A comprovação da existência das vias de síntese destes compostos e de nucleotídeos no micélio fúngico ligado às raízes foi obtida por MASKALL (1980) através do fornecimento de compostos orgânicos marcados, como por exemplo glicose, ao micélio extraradicular. A incorporação do carbono em frações mais estáveis como proteínas, polissacarídeos e parede celular ocorre mais tardiamente, evidenciando a capacidade destes fungos em degradar e remobilizar o carbono celular para as diferentes vias anabólicas do metabolismo,BEVEGE *et alii* (1975) e MASKALL (1980). O estudo detalhado da fração de

lipídios revela que o micélio ligado às raízes é muito rico em lipídios neutros, apresentando menores concentrações de ácidos graxos livres, esteroídes, ésteres de esteroídes e fosfolipídios, mas parece não conter glicolipídios, COOPER & LÖSEL (1978). NAGY *et alii* (1980) relatam a presença de 3 ácidos graxos, não-identificados, apenas em raízes micorrizadas. PACOVSKY & FULLER (1988) e PACOVSKY (1989) também detectaram a presença de 5 ácidos graxos específicos de raízes colonizadas. Estes resultados sugerem que os fungos MVA, quando em simbiose, possuem as vias metabólicas de síntese de vários ácidos graxos, os quais são relevantes não apenas como reserva energética, mas também como componentes essenciais de membranas celulares, PACOVSKY & FULLER (1988).

Esses estudos *in vivo* fornecem evidências indiretas da permeabilidade de fungos MVA a compostos orgânicos e indicam que as vias básicas de metabolismo de carbono são operantes no micélio destes fungos em associação com o hospedeiro.

2.2.2. Fisiologia da germinação e crescimento micelial *in vitro*

Os estudos do comportamento de fungos MVA *in vitro* tiveram inicio em 1909 com os trabalhos de Mágrau na França, mas só foram intensificados na década de 50 com os trabalhos de GERDEMANN (1955), GODFREY (1957) e MOSSE (1959). A metodologia

utilizada nestes estudos envolve a transferência de inóculo asséptico, geralmente esporos ou fragmentos de raízes colonizadas, para placas contendo areia lavada ou meios nutritivos mais complexos, avaliando-se, ao final de um período de incubação sob condições controladas de temperatura e luminosidade, a porcentagem de germinação dos esporos, o número e o comprimento do tubo germinativo, o volume e a morfologia do micélio produzido. Este enfoque experimental tem possibilitado a caracterização dos efeitos de inúmeros fatores físicos e de nutrientes orgânicos e inorgânicos sobre a germinação e crescimento micelial de várias espécies de fungos MVA, HEPPER (1984b) e SIQUEIRA *et alii* (1985).

A germinação dos esporos destes fungos é um processo complexo e envolve a interação de uma multiplicidade de fatores. Segundo TOMMERUP (1985),a germinação ocorrerá quando o balanço entre os fatores indutores endógenos dos esporos e os fatores inibitórios do meio forem favoráveis à germinação. Os fatores endógenos mais relevantes no controle do potencial germinativo dos esporos são a idade fisiológica dos esporos, DANIELS & GRAHAM (1976); DANIELS & MENGE (1980); HARDIE (1984) e TOMMERUP (1983, 1985) e, possivelmente, a presença de autoinibidores, WARTRUD *et alii* (1978). Dentre os fatores exógenos, os efeitos mais consistentes são os da temperatura e pH, sendo a porcentagem máxima de germinação obtida em valores de temperatura e pH semelhantes ao do habitat natural, SCHENCK *et alii* (1975). Por outro lado, quando tensões de O_2/CO_2 *in vitro* são

equivalentes às prevalecentes na rizosfera, a germinação de esporos é inibida, Le TACON *et alii* (1983).

O processo de germinação é também influenciado por compostos orgânicos comumente encontrados em extratos e exsudatos de raízes ou de outras partes vegetais. Os diversos açúcares estudados, mesmo quando em baixas concentrações, são definitivamente inibitórios à germinação, MOSSE (1959) e SIQUEIRA *et alii* (1982). Entre os ácidos orgânicos estudados, apenas o ácido D-Galacturônico (1g/l) exerceu efeito estimulatório sobre a germinação, sendo os demais inibitórios, SIQUEIRA & HUBBELL (1986) e HEPPER (1983b). Contudo, a adição de vitaminas como tiamina e/ou ácido nicotínico pode resultar em maiores porcentagens de germinação, HEPPER & SMITH (1976) e SIQUEIRA *et alii* (1982).

Os efeitos inibitórios de compostos inorgânicos sobre a germinação são marcantes. Sais de *Na*, *Cl*, *Cu* e *Zn* são notadamente inibitórios, sendo os mesmos preferencialmente omitidos dos meios de cultivo utilizados, HIRREL (1981), HEPPER (1979) e HEPPER & SMITH (1976). Fontes inorgânicas de nitrogênio e fósforo são pouco relevantes para a germinação destes fungos, DANIELS & TRAPPE (1980), HEPPER (1983a), KOSKE (1981a) e PONS & GIANINAZZI-PEARSON (1984). Dentre os compostos inorgânicos estudados, apenas $Ca(H_2PO_4)_2H_2O$ (20 mg/l), exerceu efeito estimulatório sobre a germinação, SIQUEIRA *et alii* (1982).

A inexistência de efeitos positivos marcantes da adição de nutrientes sobre a germinação de fungos MVA, sugere que os

esporos são entidades pré-programadas e auto-suficientes para o processo de germinação, SIQUEIRA *et alii* (1985). Entretanto, o crescimento micelial subsequente pode ser estimulado por diversos fatores do meio.

Os estudos sobre fatores que influenciam o crescimento micelial *in vitro* baseam-se na premissa básica de que o crescimento obtido no controle, sem a adição de nutrientes, é resultante da utilização das reservas endógenas do inóculo e que qualquer estimulo proporcionado pelo fator estudado é o reflexo de sua capacidade de suprir um requerimento nutricional e fisiológico do fungo, MOSSE (1959). Estes estudos buscam estabelecer as condições ideais de incubação e, principalmente, obter fontes de carbono e de nutrientes minerais para sustentar o crescimento micelial *in vitro*.

O micélio de fungos MVA exibe adaptação fisiológica à temperatura e pH como a germinação, mas tende a ser menos sensível a pequenas variações destes fatores, NADARAJAH & NAWAWI (1987) e SIQUEIRA *et alii* (1982). Entretanto, a sensibilidade das hifas à luminosidade, a baixos potenciais de água, a baixas tensões de O_2 e à presença de CO_2 é bastante acentuada, KOSKE (1981a), Le TACON *et alii* (1983), TOMMERUP (1984) e WARTRUD *et alii* (1978b).

O crescimento micelial é inibido por concentrações de sais de *N*, *K*, *Na*, *Al*, *Cu*, *Zn* e *Mn* muito abaixo das encontradas no solo onde se localiza o micélio extraradicular, HEPPER (1983a), HEPPER & SMITH (1976), HIRREL (1981) e SIQUEIRA *et*

alii (1982, 1984). A resposta em crescimento à adição de fontes de fósforo, ao contrário da germinação, é variável e parece ser determinada pela fonte, concentração e pH utilizados, HEPPER (1979, 1983a), KOSKE (1981a), LOUIS & LIM (1988), SILVA *et alii* (1989) e SIQUEIRA *et alii* (1982). Efeitos estimulatórios marcantes são obtidos com a adição de fontes de enxofre, principalmente sulfitos e metabisulfitos, que aumentam de 11 a 17 vezes o volume de micélio produzido, HEPPER (1984a). Os compostos inorgânicos podem ainda causar modificações morfológicas e fisiológicas no micélio como aumento de ramificações, HIRREL (1981), aumento do número de tubos germinativos por esporo e alterações na intensidade da corrente citoplasmática, PONS & GIANINAZZI-PEARSON (1984).

Inúmeros compostos orgânicos têm sido testados como fontes de carbono para o crescimento micelial de fungos MVA *in vitro*. Vários açúcares têm sido testados em concentrações que variam de 0,4 a 30g/l. Todos os açúcares estudados são inibitórios para o crescimento micelial em concentrações superiores a 4g/l, sendo o crescimento estimulado ou não em menores concentrações, HEPPER (1979, 1983b), MOSSE (1959) e SIQUEIRA *et alii* (1982). A ação inibitória da arabinose constitui uma exceção, visto que inibe o crescimento micelial mesmo quando fornecida em baixas concentrações (1,2 g/l), SIQUEIRA & HUBBELL (1986) e SIQUEIRA *et alii* (1982). Os efeitos inibitórios de açúcares podem ser entendidos considerando-se que a evolução de simbioses mutualistas entre plantas e microrganismos ocorreu

basicamente através da repressão do potencial enzimático dos microrganismos pelos produtos da fotossíntese, principalmente açúcares, translocados para o local da colonização, LEWIS (1974). Assim, os efeitos inibitórios de carboidratos sobre o crescimento de fungos MVA *in vitro* refletem, provavelmente, o processo de repressão catabólica ao qual estes fungos são submetidos em simbiose e podem representar o mecanismo através do qual a planta hospedeira restringe a infecção MVA ao nível das camadas mais externas do córtex, como proposto por MOSSE (1959) e por SIQUEIRA *et alii* (1982).

Efeitos estimulatórios têm sido frequentemente obtidos com a adição de sacarose (1 a 4 g/l) a diferentes meios de cultivo, sugerindo ser a sacarose a melhor fonte de carbono para o crescimento, CARR *et alii* (1985), SIQUEIRA & HUBBELL (1986) e SIQUEIRA *et alii* (1982). O estímulo pela presença de glicose ocorre em concentrações ainda mais baixas (0,4 a 0,8 g/l) que as relatadas para sacarose, SIQUEIRA & HUBBELL (1986), provavelmente pela maior facilidade de absorção deste monossacarídeo em relação ao dissacarídeo, o qual possívelmente requer hidrólise enzimática antes da absorção.

Respostas variáveis são obtidas com a adição de ácidos orgânicos aos meios de cultivo. O único relato de efeito estimulatório destes compostos sobre o crescimento micelial de fungos MVA é o de MOSSE (1959), no qual a adição de ácido tartárico (2g/l) aumentou o crescimento micelial de esporos pré-germinados. Porém, em geral, concentrações de ácidos orgânicos

iguais ou superiores a 2 g/l são inibitórias para o crescimento micelial, como relatado para os ácidos aspártico, málico, pirúvico, succínico e tartárico por SIQUEIRA & HUBBELL (1986) e por SIQUEIRA *et alii* (1982). A ausência de efeitos significativos destes e de vários outros ácidos orgânicos sobre o crescimento micelial de Glomus caledonium quando os mesmos foram adicionados ao meio em concentrações de 10 ou 50 mg/l, HEPPER (1983b), sugerem, por outro lado, que o crescimento micelial não é influenciado por baixas concentrações destes compostos. Nota-se, assim, que os efeitos de ácidos orgânicos sobre o crescimento micelial de fungos MVA parecem ser dependentes dos ácidos e concentrações estudadas.

Os estudos sobre os efeitos de vitaminas e aminoácidos são pouco numerosos. A adição de tiamina (0,01 a 10 mg/l) aos meios de cultivo tem proporcionado aumentos de 2 a 4 vezes no volume de micélio produzido, HEPPER (1979) e SIQUEIRA *et alii* (1982). Sabe-se, ainda, que riboflavina (0,4 mg/l) não influencia o crescimento micelial, HEPPER (1979). Dentre os aminoácidos, apenas glicina, cistina, lisina e a fonte complexa de aminoácidos, peptona, têm mostrado efeitos estimulatórios, HEPPER (1979) e HEPPER & JAKOBSEN (1983).

Os efeitos estimulatórios de exsudatos de raízes, ELIAS & SAFIR (1987), GRAHAM (1982), MOSSE & HEPPER (1975), fragmentos de sementes, GERDEMANN (1955), HEPPER (1979) e extratos de solo e de células vegetais,MOSSE (1959), PAULA (1988), SIQUEIRA & HUBBELL (1986) são frequentemente relatados na literatura.

Atualmente, o fracionamento destes compostos orgânicos complexos e a caracterização das moléculas envolvidas na promoção do crescimento constituem a linha de pesquisa mais promissora. Composto capaz de estimular o crescimento de fungos MVA foi recentemente isolado de raízes e caracterizado quimicamente por pesquisadores da Michigan State University - EUA (J. O. SIQUEIRA, comunicação pessoal).

Os estudos conduzidos até o presente permitiram a identificação de vários aspectos da fisiologia dos processos de germinação e crescimento micelial de várias espécies de fungos MVA *in vitro*. Contudo, meio de cultura capaz de sustentar o crescimento micelial por períodos prolongados e de estimular a esporulação na ausência de raízes ainda não foi formulado e continua-se com as mesmas dúvidas e indagações dos pesquisadores do início do século. Além disso, estes estudos evidenciam que o lento avanço na compreensão do processo de crescimento destes fungos se deve a diversos fatores como: (a) à variabilidade de respostas obtidas com diferentes espécies e mesmo entre isolados de uma mesma espécie, sugerindo que a resposta obtida é dependente do estado fisiológico e da capacidade metabólica intrínseca do inóculo utilizado, (b) ao número restrito de espécies estudadas, o que restringe o estabelecimento de padrões gerais de respostas a um dado fator, (c) dificuldade de padronização do inóculo quanto às características morfofisiológicas, (d) a inviabilidade de repicagem do micélio cenocítico, que mesmo superada, deparará com as dificuldades impostas pelo

provável caráter heterocariótico destes fungos, que faz com que diferentes segmentos do micélio sejam, provavelmente, geneticamente distintos e (e) a carência de métodos adequados para estudos dessa natureza.

A inabilidade de diversas fontes de carbono em sustentar o crescimento micelial de fungos MVA *in vitro* é surpreendente, principalmente quando se considera que a disponibilidade de carbono foi, provavelmente, um dos fatores que mais contribuiu, através da seleção natural, para a evolução do hábito endofítico das MVA, READ (1987). Esta aparente inabilidade de fungos MVA em metabolizar compostos orgânicos *in vitro* é, portanto, inesperada e intrigante, principalmente quando se considera que as vias básicas do metabolismo de carbono são operantes no micélio ligado às raízes (item 2.2.1). Isto sugere que a ausência de crescimento micelial *in vitro* pode ser o resultado da inoperância de uma ou mais vias metabólicas no micélio produzido na ausência do hospedeiro. Isto implicaria que durante o processo de evolução desta simbiose, a planta hospedeira teria assumido o controle, pelo menos parcial, do metabolismo do fungo. Consequentemente, o seu crescimento na ausência do hospedeiro só ocorrerá se um fator específico, com ação indutora de certos genes, estiver presente no meio de cultivo. Suporte para esta hipótese poderá ser fornecido por estudos bioquímicos de fungos MVA *in vitro* que demonstrem a inoperância das vias metabólicas codificadas pelos genes sob controle do hospedeiro.

2.2.3. Bioquímica de fungos MVA

Os estudos de bioquímica de fungos MVA baseiam-se na premissa básica de que a ausência de crescimento extensivo *in vitro* é decorrente da inoperância de uma ou mais vias metabólicas essenciais. Para tanto, estudam-se a composição química de esporos não-germinados, as mudanças de composição decorrentes do processo de germinação e as capacidades metabólicas do micélio produzido *in vitro*.

Esporos não-germinados são muito ricos em lipídios neutros, esteroides e fosfolipídios, os quais representam cerca de 46% do peso seco dos esporos. Glicolipídios não são, geralmente, encontrados, BEILBY & KIDBY (1980a,b). A classe predominante é a de lipídios neutros (95% dos lipídios totais), a qual é composta primariamente por triacilglicerídios. Os lipídios neutros de fungos MVA apresentam uma maior concentração de ácidos graxos polinsaturados de cadeias longas (14 a 26 átomos de carbono) que os de outros biotróficos, e é provável que os mesmos estejam envolvidos na manutenção da viabilidade dos esporos no solo, conferindo-lhes maior flexibilidade de membranas em condições de baixas temperaturas e uma menor sensibilidade à fotoxidação em temperaturas mais elevadas, BEILBY (1980).

O estudo das mudanças na composição de lipídios, decorrentes do processo de germinação e elongação,mostrou que os lipídios neutros predominam também durante o crescimento do tubo germinativo. No período inicial de crescimento, a ação de lipa-

ses resulta na degradação de triacilglicerídios com o consequente aumento de ácidos graxos livres. Durante a elongação subsequente, o fungo utiliza os ácidos graxos liberados para a síntese global de todas as demais classes de lipídios presentes no micélio, incluindo mono, diacil e triacilglicerídios, hidrocarbonetos, diversos tipos de esteroídes e fosfolipídios. Nota-se a ocorrência de uma crescente saturação dos ácidos graxos com a elongação micelial, indicativa de que há uma diminuição da fluidez de membranas concomitantemente ao processo de elongação, BEILBY & KIDBY (1980a).

A utilização de precursores marcados e inibidores metabólicos tem contribuido de forma significativa para a determinação das vias anabólicas e catabólicas operantes em fungos MVA durante os processos de germinação e crescimento micelial *in vitro*. BEILBY & KIDBY (1982) demonstraram que em Glomus caledonium, os processos metabólicos são ativados imediatamente após a hidratação dos esporos. Após 35 minutos detecta-se a incorporação de bases nitrogenadas em RNA e de aminoácidos em proteínas, havendo evidências de que as enzimas necessárias à síntese de ácidos ribonucléicos estão presentes nos esporos antes da germinação. A incorporação de aminoácidos marcados na fração proteíca é inicialmente lenta, sugerindo que estes fungos utilizam aminoácidos armazenados nos esporos nos estágios iniciais da síntese proteíca, BEILBY & KIDBY (1982), a qual parece ser essencial tanto para a germinação quanto para o crescimento micelial *in vitro*, HEPPER (1979).

O destino das moléculas de carbono provenientes de substratos orgânicos foi demonstrado através da utilização de ^{14}C-acetato. Este composto é prontamente convertido em ácidos orgânicos, carboidratos neutros e aminoácidos por esporos de Glomus caledonium, BEILBY & KIDBY (1982). Os principais aminoácidos sintetizados são asparagina, arginina, ácido glutâmico e glutamina que representam 71% dos aminoácidos sintetizados. Prolina e metionina não foram encontrados nestes estudos, sugerindo a inexistência de vias metabólicas de síntese desses aminoácidos ou uma síntese tardia. A síntese de lipídios só é iniciada após 2 horas de hidratação, ocorrendo uma intensa síntese de diacil e triacilglicerídios e em menor intensidade a de ácidos graxos livres, esteroídes livres e fosfolipídios. Estes resultados demonstram que o carbono exógeno é prontamente absorvido e metabolizado pelo micélio de fungos MVA *in vitro*, na ausência de raízes vivas.

Os esporos de Glomus caledonium apresentam, ainda, a habilidade de sintetizar ATP logo após a hidratação. A produção de ATP aumenta em proporção semelhante à dos demais compostos sintetizados pelo fungo, BEILBY & KIDBY (1982). A capacidade de geração de energia por fungos MVA foi também relatada por MAcDONALD & LEWIS (1978), os quais através do emprego de técnicas citoquímicas, inferiram que a via glicolítica, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, a via das pentoses, a oxidação de aminoácidos e de NADH e NADPH ocorriam no micélio e esporos vegetativos de Glomus mosseae.

A capacidade de replicação do material genético em fungos MVA é sugerida pelos estudos de BEILBY (1983) e de HEPPER (1979), os quais fornecem evidências de que a expressão de genes mitocondriais é requerida para a germinação destes fungos e que os produtos de tradução destes genes estão, provavelmente, envolvidos nos processos que controlam a ramificação do micélio. A capacidade de replicação do DNA é também sugerida por estudos citológicos *in vivo* que fornecem evidências da existência de núcleos em processo de divisão mitótica no micélio destes organismos, BONFANTE-FASOLO *et alii* (1987). Entretanto, BURGRAAF & BERINGER (1989), utilizando inibidores metabólicos e precursores marcados, sugerem que os fungos MVA são incapazes de replicar o DNA durante e após a germinação. Estes autores propõem que os núcleos presentes nas estruturas fúngicas *in vitro* são provenientes de mobilização dos núcleos do esporo "mãe".

A importância dos estudos bioquímicos acima relatados, reside, em primeiro lugar, na demonstração da permeabilidade de fungos MVA *in vitro* a diversos aminoácidos, bases nitrogenadas, acetato e fontes inorgânicas de nitrogênio. Esta comprovação da permeabilidade a compostos orgânicos e inorgânicos, além de confirmar as observações realizadas *in vivo*, sugere que o biotrofismo obrigatório destes fungos não está aparentemente ligado à inabilidade de absorção dos compostos fornecidos pelos meios de cultivo empregados *in vitro*. Entretanto, o aspecto mais relevante dos estudos bioquímicos está na constatação de

que as vias básicas do anabolismo e catabolismo celular são, provavelmente, operantes em esporos e micélio de fungos MVA, na ausência de raízes vivas. A possibilidade de deficiência em uma ou mais vias metabólicas não pode, entretanto, ser descartada como explicação para o biotrofismo obrigatório de fungos MVA, pois isto exigiria o estudo pormenorizado de todas as enzimas envolvidas no metabolismo celular.

Nota-se que o conhecimento acerca do processo de crescimento de fungos MVA *in vitro* é ainda incipiente e fragmentado. A caracterização nutricional, fisiológica e bioquímica de um maior número de espécies se faz necessária para que se possa estabelecer os fatores condicionantes do biotrofismo obrigatório destes organismos e viabilizar a sua utilização em larga escala.

[redacted]

3. MATERIAL E METODOS

Para caracterizar o crescimento micelial do fungo MVA Gigaspora gigantea (Nicolson & Gerdemann) Gerdemann & Trappe, estabelecer sua curva de crescimento e estudar os efeitos de compostos orgânicos sobre o seu crescimento micelial *in vitro*, foram conduzidos vários experimentos no Laboratório de Microbiologia do Solo da Escola Superior de Agricultura de Lavras.

Inicialmente, visando determinar o período de incubação adequado para avaliação de experimentos de nutrição, determinou-se uma curva de crescimento micelial em meio nutritivo. Posteriormente, considerando-se que o fungo poderia utilizar as fontes de carbono numa fase mais tardia do crescimento, estudou-se a curva de crescimento micelial em meio nutritivo com e sem sacarose, por período longo o suficiente para permitir a septação e retração citoplasmática da maioria das hifas.

Vários ensaios foram, então, conduzidos visando determinar os efeitos de carboidratos sobre o crescimento micelial do fungo. Considerando-se a possibilidade do fungo utilizar mais eficientemente as fontes de carbono exógenas após o esgotamento de suas próprias reservas, estudaram-se os efeitos

de períodos de crescimento, na ausência de fontes de carbono, sobre a utilização subsequente de sacarose. Os efeitos de ácidos orgânicos, em diferentes concentrações, foram também estudados.

As concentrações testadas foram escolhidas com base na literatura e de forma a serem intermediárias a concentrações que não influenciam o crescimento e a concentrações que exercem efeitos inibitórios sobre o crescimento micelial *in vitro*, no intuito de se traçar curvas de resposta aos compostos testados.

3.1. Metodologia geral

Os esporos de G. gigantea foram multiplicados em raízes de Brachiaria decumbens cultivada em vasos contendo 4kg de Latossolo Roxo desinfestado com brometo de metila (260 cc/m^3 de substrato). Os vasos foram irrigados diariamente com água desmineralizada para saturação de cerca de 60% do volume total de poros e periodicamente com 10 ml de solução de Hoagland sem fósforo, diluída 10x. Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação por 12 a 14 meses, antes de serem utilizados.

Os esporos foram extraídos diretamente dos vasos de multiplicação por peneiramento úmido, conforme sugerido por GERDEMANN & NICOLSON (1963), em peneiras com malha de 0,720 e 0,105 mm de abertura. O material retido na última peneira foi submetido à centrifugação em água por 3 minutos a 2000 rpm e em

solução de sacarose 45% (P/V) por 2 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante contendo os esporos foi recolhido em peneira de 0,044 mm de abertura e lavado com forte jato de água corrente. Os esporos obtidos foram selecionados sob microscópio estereoscópico (20×) para obtenção de um grupo morfologicamente homogêneo. Esporos escuros, esporos nitidamente lesados ou com detritos aderidos à parede foram descartados.

Em câmara asséptica de fluxo laminar, procedeu-se a desinfestação superficial dos esporos em filtro Millipore (Swinex 25) com membrana de papel (Whatman nº 1), acoplado a seringa de 20 ml, conforme descrito por COLOZZI-FILHO (1988). Os esporos desinfestados foram removidos da superfície da membrana para uma placa de Petri contendo água destilada e esterilizada e transferidos, com o auxílio de pinça flexível e de ponta fina, para placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo 10 ml de ágar-água 1% (pH 6,4 ± 0,2) para germinação. O ágar foi marcado com perfurador de rolha de 1 cm de diâmetro, colocando-se um esporo no centro de cada círculo demarcado. Em cada placa foram colocados 30 esporos.

As placas foram incubadas em estufa a 25 - 28 °C, no escuro e após 2 a 3 dias de incubação submetidas à observação em microscópio estereoscópico (20x) em câmara asséptica de fluxo laminar. Esporos de cor amarela-brilhante, sem manchas escurecidas e que apresentavam um ou mais tubos germinativos com comprimento inferior a duas vezes o diâmetro do esporo foram utilizados nos experimentos. A ausência de crescimento bacteria-

no ou de fungos contaminantes sobre os esporos foi aceita como prova de assepsia.

O meio nutritivo utilizado em todos os experimentos resultou de modificações do meio de HEPPER (1979) através de estudos preliminares com G. gigantea. Sua composição é apresentada no Quadro 1. O meio foi preparado a partir de soluções estoque (concentradas 10 x) mantidas em frascos escuros a 4°C. As vitaminas foram reunidas em uma única solução estoque esterilizada por filtração em membrana (0,45 μm). As soluções estoque das fontes de carbono foram esterilizadas separadamente por autoclavagem a 121 °C por 20 minutos. Para preparação do meio, os constituintes minerais foram adicionados à água destilada e o pH acertado para 5,5 ± 0,2 com NaOH 1N ou HCl 0,1M.O volume foi acertado de forma a permitir que a adição das vitaminas e da fonte de carbono,após autoclavagem do meio, completasse 200 ml.

Para instalação dos experimentos, os esporos pré-germinados e assépticos foram transferidos para tubos de ensaio (1,8 × 14,5 cm) contendo 3 ml de meio nutritivo líquido,suplementado com compostos orgânicos ou não de acordo com cada experimento. Os tubos foram incubados em estufa,25 a 28 °C, no escuro.

Ao final dos períodos de incubação, o sobrenadante dos tubos foi colhido para determinação do pH e os esporos foram observados sob microscópio estereoscópico (20x) para avaliação das características morfológicas do micélio produzido e contagem de células auxiliares. Para avaliação do crescimento micelial foi utilizado um método de interseções de hifas modificado

QUADRO 1. Composição do meio nutritivo utilizado nos diversos experimentos.

Composto	Marca	Concentração mg/l
KCl	Merck	4,0
KNO_3	Merck	6,40
$MgSO_4 . 7H_2O$	Berzog	4,0
$Ca(H_2PO_4)_2 . H_2O$	Riedel - de - häen	0,8
FeNa EDTA	Reagen	0,19
Tiamina	Merck	0,40
Biotina	Merck	0,04
Cianocobalamina	Merck	0,04

de HEPPER & JAKOBSEN (1983). O micélio proveniente de cada parcela experimental foi colocado em um tubo de ensaio (1,5 x 12,5 cm) contendo 0,5 ml de água destilada e 50 contas de vidro (1 mm de diâmetro). O micélio foi fragmentado por agitação em vortex a 1/3 da velocidade máxima por 30 segundos. Os fragmentos obtidos foram transferidos para membrana Millipore quadriculada (HAGB 047, 9 mm^2 por quadrícula) por filtração a vácuo. Após secagem da membrana de filtro ao ar, procedeu-se a contagem, sob microscópio estereoscópico (40x), do número de fragmentos de hifas que interceptavam as linhas horizontais do filtro.

Todos os ensaios foram delineados inteiramente ao acaso e repetidos pelo menos uma vez. Os dados de contagem de interseções de hifas obtidos foram transformados por $Y = \sqrt{x + 0,5}$ e submetidos à análise de variância e regressão polinomial conforme programas do Centro de Processamento de Dados da ESAL.

3.2. Experimentos

3.2.1. Curvas de crescimento

Para determinação da curva de crescimento em meio nutritivo,os tubos contendo os esporos pré-germinados foram incubados por períodos de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 dias. Para cada tratamento foram utilizados 30 tubos, sendo cada parcela experimental constituída pelo micélio proveniente de 10 esporos.

Para determinação do efeito da adição de fonte de carbono sobre a curva de crescimento micelial, esporos pré-germinados foram incubados por 0, 2, 4, 8, 16, 32 e 48 dias em tubos de ensaio contendo 3 ml de meio nutritivo suplementado ou não com 4 g/l de sacarose. Foram utilizados 20 tubos de ensaio por tratamento, sendo cada parcela experimental constituída pelo micélio proveniente de 5 esporos.

3.2.2. Efeitos de compostos orgânicos sobre o crescimento micelial

Diferentes concentrações de carboidratos e de ácidos orgânicos foram adicionadas ao meio nutritivo, conforme Quadro 2. Cada tratamento foi constituído por 30 tubos de ensaio, sendo o crescimento micelial avaliado após 15 dias de incubação. Cada parcela experimental foi constituída pelo micélio proveniente de 10 esporos.

QUADRO 2. Concentrações dos compostos orgânicos utilizados como fontes de carbono para o crescimento micelial de G. Gigantea *in vitro*.

Compostos orgânicos	Marca	Concentrações estudadas g/l				
		0	1	2	3	4
D (+) Glicose	Pró-análysi	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
D (-) Frutose	Merck	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
L (+) Arabinose	Merck	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
α - D - Sacarose	Ecibra	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
D (+) Trealose	Riedel-de-häen	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
Manitol	Inlab	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
Amido	Reagen	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
Pectina	Sigma	0,0	0,156	0,313	0,625	1,25
Ácido pirúvico*	Merck	0,0	0,156	0,313	0,625	1,25
Ácido cítrico	Merck	0,0	0,156	0,313	0,625	1,25
Ácido oxálico	Merck	0,0	0,156	0,313	0,625	1,25
Ácido tartárico	Pró-análysi	0,0	0,156	0,313	0,625	1,25

* Fornecido como Piruvato de Sódio

3.2.3. Efeitos de pré-crescimento na ausência de fontes de carbono sobre a utilização subsequente de sacarose.

Os tratamentos constituíram-se na transferência dos esporos germinados para tubos de ensaio contendo 3 ml de meio nutritivo, procedendo-se à adição de sacarose (4 g/l) aos 0, 10 e 20 dias após a incubação. Após 30 dias de incubação, o crescimento micelial foi avaliado. Foram utilizados 20 tubos de ensaio por tratamento, sendo cada parcela experimental constituída pelo micélio proveniente de 5 esporos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Germinação e crescimento micelial de G. gigantea

A germinação dos esporos de G. gigantea em ágar-água ocorreu após um período de 2 a 4 dias de incubação pela formação de um ou mais tubos germinativos diretamente através da parede do esporo, como descrito por GERDEMANN (1955) e por KOSKE (1981a,b). Esporos de coloração amarela-esverdeada ou totalmente escurecidos não germinaram em ágar-água. Observou-se, ainda, que a umidade do ágar-água e a temperatura de incubação foram fatores relevantes na obtenção da germinação dos esporos.

O tubo germinativo, inicialmente espesso, alongou-se rapidamente produzindo ramificações bilaterais mais finas, as quais cresceram no interior do ágar, na sua superfície ou formando um micélio aéreo semelhantemente ao descrito por WARTRUD *et alii* (1978b) para Gigaspora margarita. Corrente citoplasmática bidirecional foi observada com facilidade junto à origem do tubo germinativo nesta fase inicial do crescimento.

Após transferência para o meio nutritivo líquido, a elongação e ramificação do micélio se intensificaram, resultando na formação de uma rede micelial dispersa. Observou-se, freequentemente, a formação de ramificações digitiformes finas,

semelhantes a arbúsculos, em pontas de hifas distais. A semelhança destas estruturas com os arbúsculos foi também relatada por MOSSE (1959), que atribuiu-lhes a função de órgãos de absorção. HEPPER (1987) propõe que a indução destas ramificações *in vitro* poderia constituir um passo importante para o estabelecimento de culturas puras de fungos MVA, devido à possibilidade de poderem apresentar permeabilidade diferenciada aos constituintes do meio. Em alguns ensaios observou-se, ainda, a extrusão do citoplasma nas pontas de algumas hifas. É possível que a ruptura do ápice tenha ocorrido como consequência de hipotonicidade do meio, como sugerido para outros fungos por BARTNICKI-GARCIA & LIPPMAN (1972) e por PARK & ROBINSON (1966).

Ao final dos períodos de incubação, várias hifas apresentaram-se septadas e sem conteúdo citoplasmático. Outra característica do micélio nesta fase foi o aspecto vacuolado das hifas. As características morfológicas do micélio de G. gigantea não foram aparentemente influenciadas pela adição dos compostos orgânicos ao meio nutritivo.

4.2. Curvas de Crescimento Micelial

Foram observadas alterações significativas no crescimento micelial de G. gigantea no decorrer dos períodos de incubação. (Figura 1 e Quadro 1A). A curva de crescimento micelial

$\hat{Y} = 5,72 + 1,27x - 0,02x^2$ $(P \leq 0,005)$

$r^2 = 0,90$

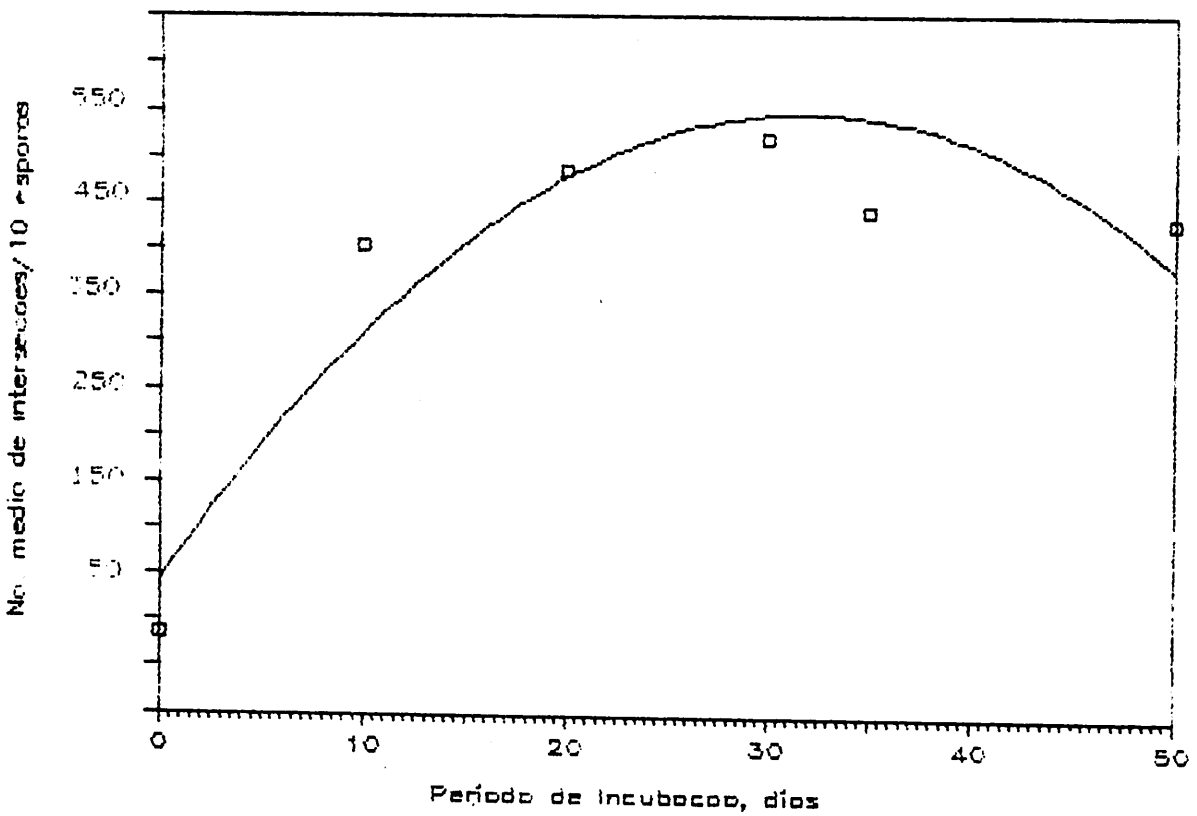


FIGURA 1. Curva de crescimento micelial de G. gigantea em meio nutritivo (Equação de dados transformados por $Y = \sqrt{x + 0,5}$).

foi semelhante à de outros fungos filamentosos, entretanto, nota-se que a curva não apresenta uma fase Lag na qual, segundo GARRAWAY & EVANS (1984), a produção micelial dos fungos é aproximadamente nula. A ausência desta fase Lag na Figura 1 se deve ao fato de terem sido utilizados esporos pré-germinados. Neste caso, a fase Lag foi constituída pelo período de tempo necessário para hidratação dos esporos e emergência do tubo germinativo em ágar-água.

A segunda fase do crescimento micelial de G. gigantea *in vitro* (0 a 15 dias) foi típicamente exponencial. Este crescimento exponencial foi, provavelmente, resultante da formação de ramificações no micélio, as quais contribuiram para o aumento do número de pontas de hifas em crescimento em função do tempo, como demonstrado para outros fungos filamentosos por TRINCI (1974). HEPPER (1983b) e MOSSE (1959) relatam que o crescimento micelial de espécies do gênero Glomus é mais rápido até 10 dias de incubação. A maior duração deste período de rápido crescimento em G. gigantea no presente estudo pode ser um reflexo do maior volume de reservas no interior dos esporos desta espécie, e indica que a curva de crescimento pode ser variável para diferentes espécies.

A terceira fase (15 a 30 dias) se caracterizou por desaceleração do processo de crescimento, indicativo de diminuição da taxa de ramificação e de elongação das hifas. Esta diminuição de crescimento é, em geral, atribuída aos fatos de: (1) um ou mais nutrientes atingirem concentração limitante

no meio; (2)mudanças de fatores como pH e aeração para valores desfavoráveis e (3) elevação de metabólitos excretados pelo fungo a níveis tóxicos para o crescimento. Os dados obtidos neste estudo permitem descartar mudanças de pH como o fator responsável pela desaceleração do crescimento, visto que a determinação do pH final do meio de cultivo mostrou que a acidificação não foi tão acentuada (pH 5.50 inicial para pH 4,80 final).

Em torno de 30 dias de incubação o fungo entrou em fase estacionária, indicativo de que o processo de elongação de hifas foi interrompido e de que o potencial de crescimento de G. gigantea, sob as condições experimentais utilizadas, foi esgotado. Esta interrupção do processo de elongação de hifas de G.gigantea, no presente estudo, pode ter sido um reflexo da atuação de fatores intrínsecos condicionantes do caráter biotrófico obrigatório deste fungo. Contudo, deve-se considerar a possibilidade de que isto tenha sido reflexo de inadequação ou esgotamento do meio ou mesmo de elevação da concentração de compostos tóxicos no meio, visto que 30 dias é um período, provavelmente longo de incubação em sistemas sem reciclagem de nutrientes.

A fase final da curva foi caracterizada por um declínio progressivo no crescimento. Este declínio é geralmente atribuído a um processo de autólise, no qual os fungos degradam e utilizam seus próprios constituintes celulares, conforme proposto por Lahoz *et alii*, (1966), citados por GRIFFIN (1981).

A ocorrência de autólise foi também observada por HEPPER (1983b) no micélio de Glomus caledonium, porém nenhuma referência é feita ao período no qual este processo ocorreu.

A análise da curva de crescimento (Figura 1) indica que um período de 15 dias de incubação é adequado para avaliações do crescimento micelial, pois marca o final da fase exponencial e o início da fase de desaceleração do crescimento micelial de G. gigantea *in vitro*.

A curva de crescimento micelial de G. gigantea não foi alterada pela adição de sacarose ao meio nutritivo (Figura 2 e Quadro 2A), porém houve uma tendência de menor crescimento na presença de sacarose. A ausência de modificação acentuada na curva de crescimento micelial com a adição de sacarose indica que este fungo possui uma baixa capacidade de absorção e/ou metabolização deste composto, sob as condições experimentais utilizadas. Além disso, confirma que um período de incubação de 15 dias é suficiente para determinação de respostas do crescimento micelial de G. gigantea a fatores nutricionais.

Os resultados do número total de células auxiliares produzidas pelo micélio de G. gigantea no decorrer dos períodos de incubação são apresentados no Quadro 3. Aparentemente, a produção de células auxiliares acompanha proporcionalmente o crescimento micelial do fungo, sendo este efeito marcante até 8 dias de incubação. Considerando-se que a função de células auxiliares esteja relacionada com o armazenamento de metabólitos

1 □ c/Sacarose $\hat{Y} = 4,71 + 0,95x - 0,01x^2$ $(P \leq 0,005)$

$r^2 = 0,95$

2 ◊ s/Sacarose $\hat{Y} = 5,97 + 0,91x - 0,01x^2$ $(P \leq 0,005)$

$r^2 = 0,90$

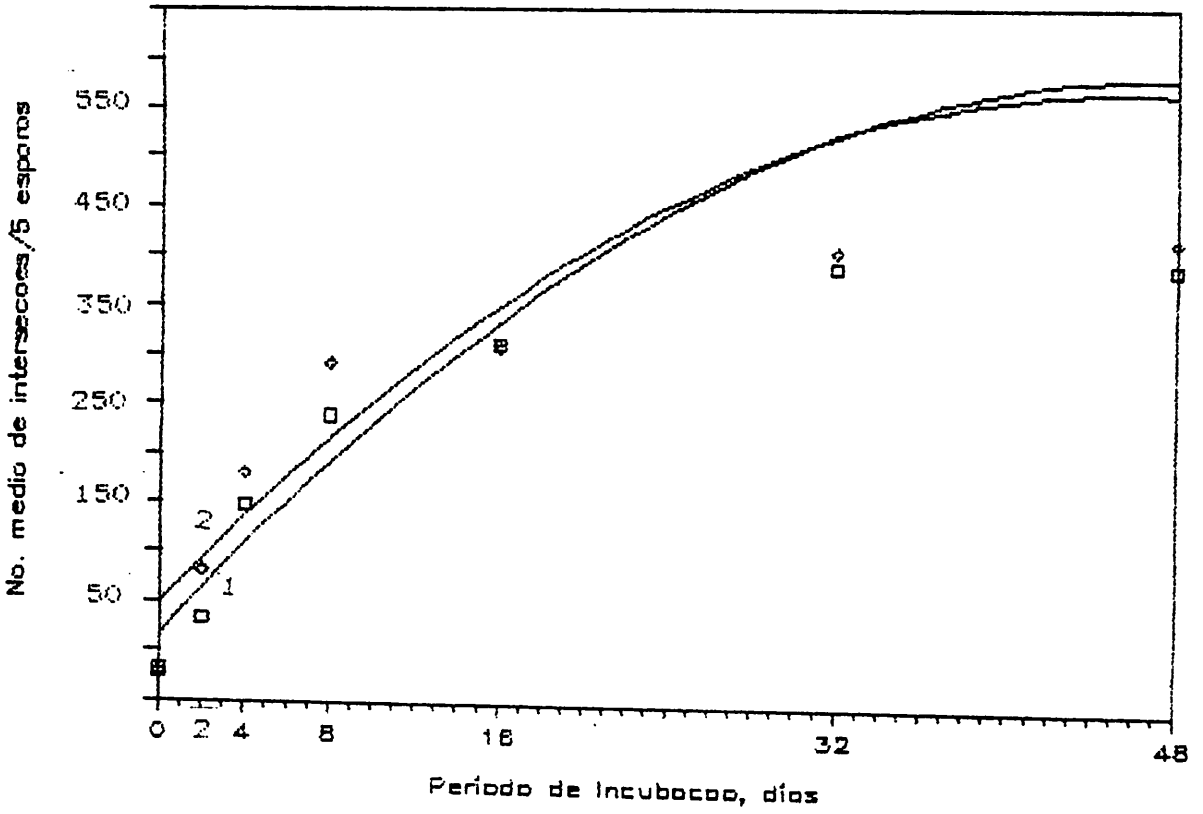


FIGURA 2. Curva de crescimento micelial de G. gigantea em meio nutritivo com e sem adição de sacarose. Média de dois ensaios. (Equação de dados transformados por $Y = \sqrt{x + 0,5}$).

QUADRO 3. Número total de células auxiliares produzidas pelo micélio de G. gigantea em meio nutritivo com e sem adição de sacarose. Média de dois ensaios. ESAL, Lavras - MG, 1990.

Tratamentos	Período de Incubação					Dias	
	0	2	4	8	16	32	48
Com Sacarose	-	02	10	42	33	50	59
Sem Sacarose	-	-	32	70	32	46	57

destes fungos, maior produção destas estruturas em função de aumentos no crescimento micelial poderia ser esperada, principalmente quando a disponibilidade de carbono não é um fator limitante no meio. Entretanto, os dados mostram grande variabilidade na produção de células auxiliares que pode ser resultante de variação na capacidade intrínseca dos esporos em formar essas estruturas.

4.3. Efeitos de carboidratos sobre o crescimento micelial

O crescimento micelial de G. gigantea, obtido em resposta à suplementação do meio nutritivo com carboidratos, foi variável para diferentes compostos e concentrações (Figura 3 e Quadro 3A).

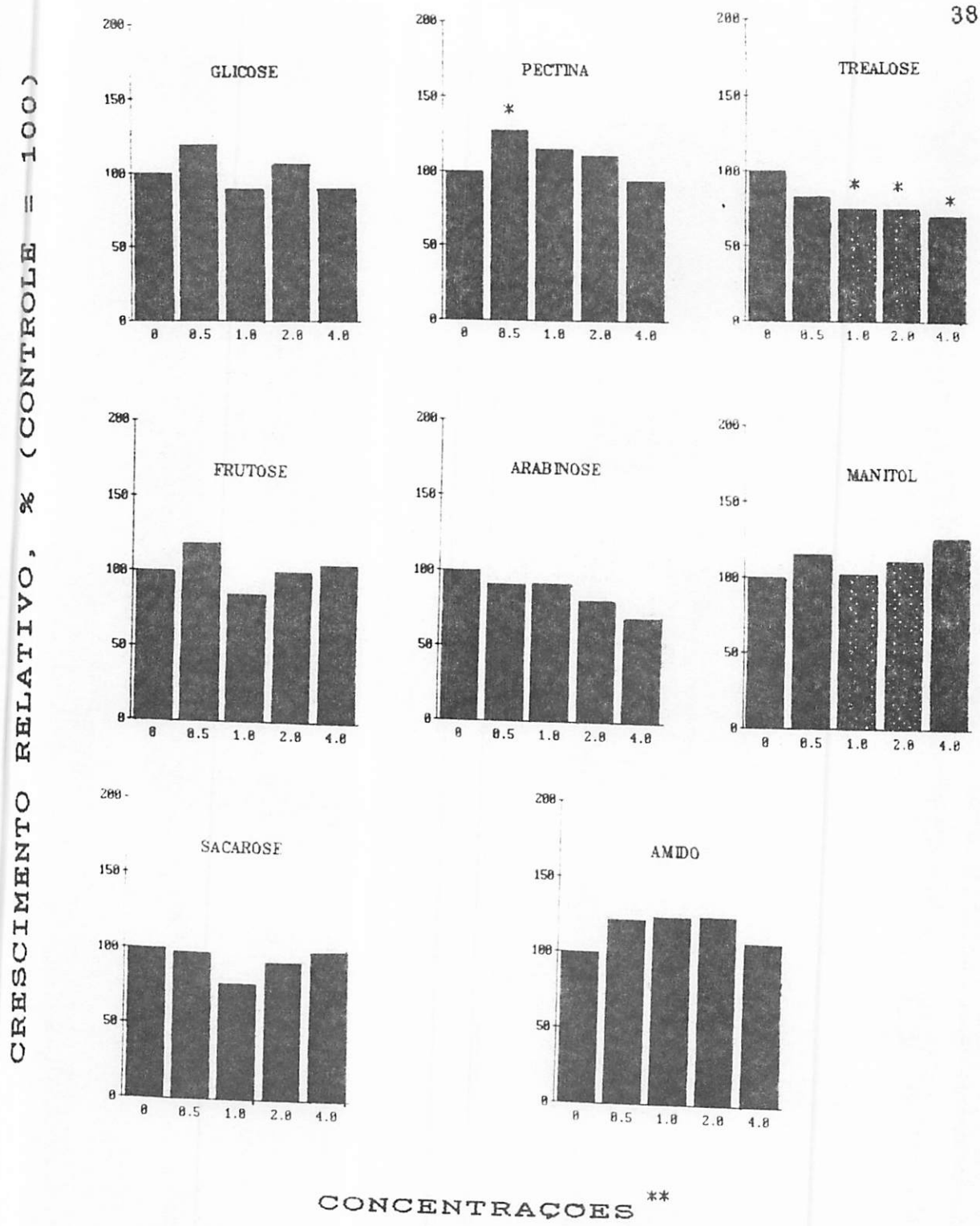


FIGURA 3. Crescimento micelial de G. gigantea em meio nutritivo suplementado com carboidratos. Média de dois ensaios.

* Médias diferem do controle pelo Teste de Tukey ($P \leq 5\%$).

** Concentrações conforme Quadro 2.

Os carboidratos glicose, pectina e trealose influenciaram significativamente o crescimento micelial de G. gigantea, sendo as curvas de regressão apresentadas na Figura 4. Contudo, a resposta à glicose não foi explicada por nenhum dos ajustes polinomiais testados. As diferenças significativas detectadas pela análise de variância encontravam-se entre as concentrações empregadas, porém o crescimento obtido na presença de glicose não diferiu significativamente do controle. Isto se deve provavelmente a variabilidade das respostas obtidas, as quais possivelmente refletem diferenças fisiológicas no inóculo utilizado. Observou-se, contudo, uma tendência de estímulo no crescimento micelial pela adição de 0,5 g/l de glicose. Esta resposta concorda com os dados da literatura que mostram que, em geral, baixas concentrações de glicose (0,4 a 0,8 g/l) são estimulatórias para o crescimento micelial de fungos MVA e que concentrações mais elevadas são inibitórias, KOSKE (1981a), MOSSE (1959), SIQUEIRA & HUBBELL (1986) e SIQUEIRA *et alii* (1982). É provável, portanto, que G. gigantea apresente as enzimas envolvidas no processo de absorção da glicose, como já demonstrado por CAPACCIO & CALLOW (1982) e por MARX *et alii* (1982) para outros fungos MVA. Estudos com ^{14}C-glicose, como os de MASKALL (1980), seriam de grande valia para testar esta hipótese.

A pectina, quando adicionada ao meio nutritivo em baixas concentrações, aumentou o crescimento micelial de G. gigantea.

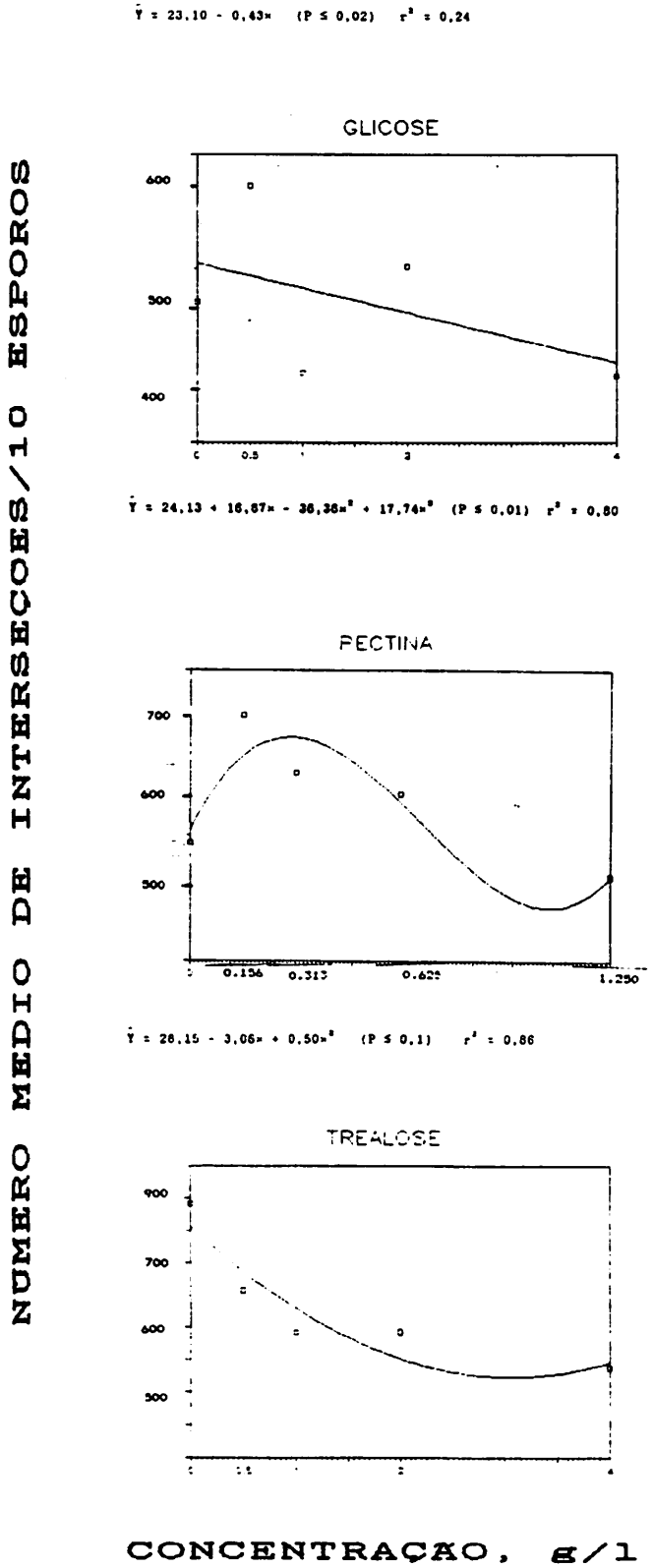


FIGURA 4. Crescimento micelial de G. gigantea em resposta à adição de glicose, pectina e trealose ao nutritivo. Média de dois ensaios. (Equação de dados transformados por $Y = \sqrt{x + 0,5}$).

Relatos da utilização de pectina por fungos MVA *in vitro* não foram encontrados na literatura. Contudo, SIQUEIRA & HUBBELL (1986) sugerem que o ácido D-Galacturônico, molécula constituinte da pectina, pode constituir-se em fonte de carbono promissora para o cultivo de fungos MVA *in vitro*, na ausência de raízes vivas. O maior crescimento micelial obtido no presente estudo com a adição de baixas concentrações de pectina sugere que G. gigantea apresenta pectinases e poligalacturonases capazes de degradar o polissacarídeo permitindo, assim, a absorção dos monômeros resultantes da degradação e sua utilização como fonte de carbono para os processos de elongação de hifas.

A capacidade de utilização de pectina por fungos MVA é sugerida também por estudos citológicos das associações MVA que demonstram um certo grau de degradação da lamela média pelas hifas do fungo durante a penetração intercelular do córtex da raiz hospedeira, GIANINAZZI-PEARSON *et alii* (1981). A existência de fibras polissacarídicas desorganizadas entre a plasmalema de ramos finos de arbúsculos e a plasmalema da célula hospedeira, tem sido proposta como evidência da capacidade do fungo MVA de lisar precursores da parede hospedeira e utilizá-los como fonte de carbono para o crescimento, BONFANTE-FASOLO *et alii* (1981) e GIANINAZZI *et alii* (1983).

A trealose exerceu efeito inibitório mesmo quando fornecida em baixas concentrações, sendo o aumento de concentração acompanhado por uma diminuição progressiva do crescimento

micelial. Contudo, o único estudo conduzido *in vitro* com este carboidrato mostrou que a sua adição (1 g/l) não influenciou significativamente o crescimento micelial de esporos pré-germinados de Glomus caledonium, HEPPER (1979), sugerindo sensibilidade diferenciada de espécies de fungos MVA a este composto. Estudos recentes, READ (1987), indicam que este dissacarídeo é o principal composto envolvido na translocação de carbono através do micélio de fungos MVA. Os efeitos detrimentais de trealose observados no presente estudo não corroboram, contudo, com a hipótese de READ (1987) de que este dissacarídeo desempenhe papel relevante na fisiologia de fungos MVA.

Não foram detectados efeitos significativos da adição de frutose, arabinose, manitol, sacarose e amido sobre o crescimento de G. gigantea. A ausência de resposta em crescimento à adição de frutose (1 g/l) foi também relatada por HEPPER (1979) para Glomus caledonium. É interessante ressaltar que este carboidrato é utilizado pelos fungos em geral, BERRY (1975), mas que em algumas espécies as enzimas envolvidas são de natureza adaptativa o que faz com que a utilização da frutose seja iniciada apenas após um perído Lag de cerca de 16 dias de incubação, Sistrom & Machlis(1955), citados por GRIFFIN (1981). Portanto, a resposta obtida no presente estudo não implica necessariamente na inabilidade de G. gigantea em utilizar a frutose como fonte de carbono para o crescimento micelial, visto que o período de incubação utilizado foi de 15 dias.

A adição de arabinose, apesar de não ter influenciado significativamente o crescimento do fungo, resultou em uma tendência de inibição com o aumento da sua concentração no meio, chegando a 25% de inibição na maior concentração estudada. HEPPER (1979) relata que a adição de arabitol, que é formado à partir de arabinose, não influenciou significativamente o crescimento micelial de esporos pré-germinados de Glomus caledonium, sendo este comportamento semelhante ao obtido no presente estudo com a arabinose. Contudo, a tendência de inibição obtida sugere que a arabinose pode ser uma das moléculas do hospedeiro envolvidas no controle da dispersão do fungo na raiz, como proposto por MOSSE (1959) para carboidratos em geral.

A ausência de efeitos da adição de manitol sobre o crescimento micelial de G. gigantea, no presente estudo, confirma os resultados obtidos por HEPPER (1979), a qual relata que a adição de manitol (1 g/l) não influenciou significativamente o crescimento micelial de Glomus caledonium. Em geral, mesmo fungos capazes de utilizar manitol como fonte primária de carbono apresentam um crescimento bem menor com este composto que o observado com outros carboidratos, BOONSAENG *et alii* (1976), e podem apresentar uma fase Lag de 5 a 10 dias antes que a resposta estimulatória seja observada, PONS *et alii* (1986). Isto sugere que o sistema de utilização do manitol, assim como o da frutose, é adaptativo em alguns fungos. Portanto, a ausência de estímulo ao crescimento na presença de manitol no

presente estudo não reflete necessariamente a inexistência de vias de oxidação deste composto no micélio de G. gigantea.

O crescimento micelial de G. gigantea não foi influenciado significativamente por sacarose quando este dissacarídeo foi adicionado ao meio nutritivo no início do período de incubação. A ausência de resposta à adição de sacarose (1 g/l) foi também relatada por HEPPER (1983b) para Glomus caledonium. Porém, a maioria dos estudos mostra que concentrações de 1 a 4 g/l são estimulatórias para o crescimento e que concentrações mais elevadas são sempre inibitórias, CARR *et alii* (1985), MOSSE (1959), SIQUEIRA & HUBBELL (1986) e SIQUEIRA *et alii* (1982).

No presente estudo, o crescimento micelial de G. gigantea foi estimulado quando sacarose foi adicionada ao meio nutritivo após 10 ou 20 dias de incubação dos esporos pré-germinados (Figura 5 e Quadro 4A). Após 20 dias de incubação, o micélio de G. gigantea já atingiu seu crescimento máximo *in vitro* e está próximo a cessar a elongação de hifas. Para produção de micélio durante estes 20 dias, o fungo provavelmente utilizou suas reservas endógenas de carbono e é possível que esta utilização tenha resultado não apenas na degradação de grande parte destas reservas, como também na desrepressão ou indução de novos sistemas enzimáticos. Isto porque, segundo GARRAWAY & EVANS (1984), mecanismos de indução, repressão, ativação e inativação enzimática são utilizados pelos fungos, sob condições de estresse, para preservação das reservas

[redacted]

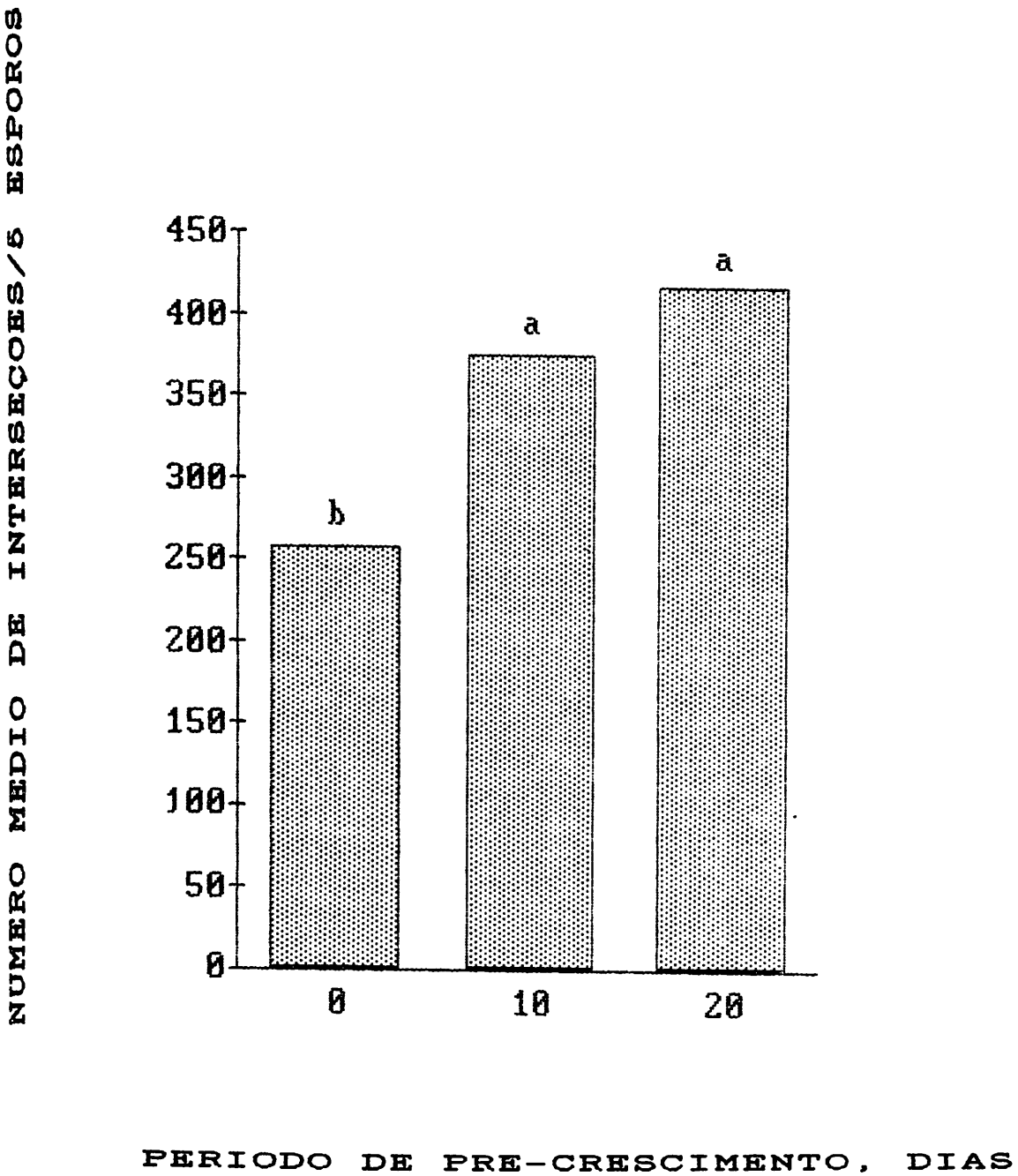


FIGURA 5. Efeitos de períodos de pré-crescimento na ausência de fontes de carbono sobre a utilização subsequente de sacarose por G. gigantea. Média de dois ensaios.

celulares e aumento da eficiência energética da célula. Consequentemente, a utilização da energia celular para síntese de novos sistemas de absorção e metabolização de nutrientes só ocorrerá após exaustão dos sistemas constitutivos operantes no micélio.

Os resultados obtidos neste ensaio sugerem que mecanismos semelhantes são provavelmente operantes no micélio de G. gigantea, visto que após um período de crescimento utilizando suas reservas endógenas de carbono este fungo respondeu positivamente à sacarose. Além disso, as observações de KOSKE (1982) de que as hifas de G. gigantea *in vitro* são atraídas intensamente por raízes hospedeiras apenas após um período de 12 a 14 dias de incubação, assim como os resultados do presente estudo, sugerem a ocorrência de modificações fisiológicas no micélio deste fungo após períodos de crescimento às expensas das reservas endógenas. É provável que estas alterações fisiológicas ocorram também sob condições naturais, pois são frequentes os relatos de estímulo ao crescimento micelial quando as hifas aproximamse das raízes hospedeiras após períodos variáveis de crescimento no solo, HEPPER (1974).

Outro carboidrato que não influenciou significativamente o crescimento micelial de G. gigantea foi o amido. Porém, nota-se que a presença deste composto no meio nutritivo tendeu a aumentar em aproximadamente 20% o crescimento do fungo, exceto na concentração mais elevada. MOSSE (1959) também relata que amido proveniente de diversas fontes não influenciou o

crescimento micelial de fungos MVA. Entretanto, é provável que sob condições naturais este polissacarídeo desempenhe papel relevante na transferência de carbono do hospedeiro para o fungo, pois a ausência de grânulos de amido em células hospedeiras colonizadas por fungos MVA sugere a solubilização deste polissacarídeo pelo hospedeiro como mecanismo de fornecimento de carbono para o crescimento do simbionte, como proposto por NEMEC (1981) e por GIANINAZZI-PEARSON *et alii* (1981).

No Quadro 4 são apresentados os resultados do número total de células auxiliares produzidas por G. gigantea em meio suplementado ou não com diferentes concentrações de carboidratos.De forma semelhante aos resultados discutidos no item 4.2., os dados sugerem a existência de uma relação de proporcionalidade entre crescimento e formação de células auxiliares, pois na presença da maioria dos compostos que estimularam ou tenderam a estimular o crescimento micelial observou-se um aumento na produção dessas células, sendo o inverso verdadeiro para os compostos com ação inibitória. Entretanto, a possibilidade de influência direta dos fatores nutricionais sobre a formação de células auxiliares não pode ser descartada, visto que compostos como frutose e manitol aumentaram a produção dessas estruturas, mas não influenciaram o crescimento micelial.

A maioria dos carboidratos estudados não influenciou o crescimento micelial de G. gigantea. Além disso, os efeitos estimulatórios da pectina e inibitórios da trealose foram pouco

QUADRO 4. Número total de células auxiliares produzidas pelo micélio de G. gigantea em meio nutritivo suplementado com carboidratos. Média de dois ensaios. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Carboidratos	Concentrações g/l				
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
Glicose	17,0	29,0	27,0	29,0	28,0
Pectina	61,0	161,0	165,0	94,0	116,0
Trealose	65,0	31,0	11,0	9,0	0,8
Frutose	59,0	81,0	76,0	67,0	34,0
Arabinose	36,0	15,0	15,0	37,0	6,0
Manitol	6,0	0,6	0,0	11,0	41,0
Sacarose	28,0	25,0	16,0	0,8	6,0
Amido	63,0	122,0	96,0	92,0	42,0

acentuados atingindo 28 e 32%, respectivamente.

Várias hipóteses podem explicar a ausência de efeitos da maioria dos carboidratos estudados sobre o crescimento micelial de G. gigantea *in vitro* : a) o fungo não apresenta as vias de absorção e/ou metabolização destes carboidratos, b) o fungo é capaz de absorver estes compostos, mas os mesmos estão sendo armazenados ou utilizados em outras funções celulares não relacionadas com a elongação de hifas, não sendo estes efeitos detectados pelo método de avaliação utilizado, c) o fungo necessita de um período de incubação mais prolongado para indução e síntese dos sistemas enzimáticos envolvidos na

utilização destes carboidratos, exceto para a sacarose cujo efeito sobre o crescimento não foi alterado até 48 dias de incubação e d) o fungo utilizou prioritariamente as suas reservas endógenas de lipídios, o que implicaria na existência de mecanismos de regulação metabólica capazes de bloquear as vias de absorção e/ou metabolização de carboidratos, como relatado para outros organismos eucarióticos por LEHNINGER (1984).

4.4. Efeitos de ácidos orgânicos sobre o crescimento micelial

Todos os ácidos orgânicos estudados influenciaram significativamente o crescimento micelial de *G. gigantea*, sendo estes efeitos dependentes das concentrações estudadas (Figura 6 e Quadro 5A). As curvas de regressão são apresentadas na Figura 7.

O crescimento micelial foi estimulado na presença dos ácidos tartárico e cítrico. Efeitos estimulatórios destes ácidos orgânicos sobre o crescimento micelial de fungos MVA foram também relatado por MOSSE (1959). Porém, HEPPER (1983b) não verificou efeitos significativos destes ácidos (0,05 g/l) sobre o crescimento micelial de *Glomus caledonium* e SIQUEIRA & HUBBELL (1986) observaram uma redução de 70% no crescimento de *Gigaspora margarita* em meio suplementado com ácido tartárico. Nota-se, assim, uma variabilidade nas respostas obtidas com diferentes espécies de fungos MVA à suplementação dos meios nu-

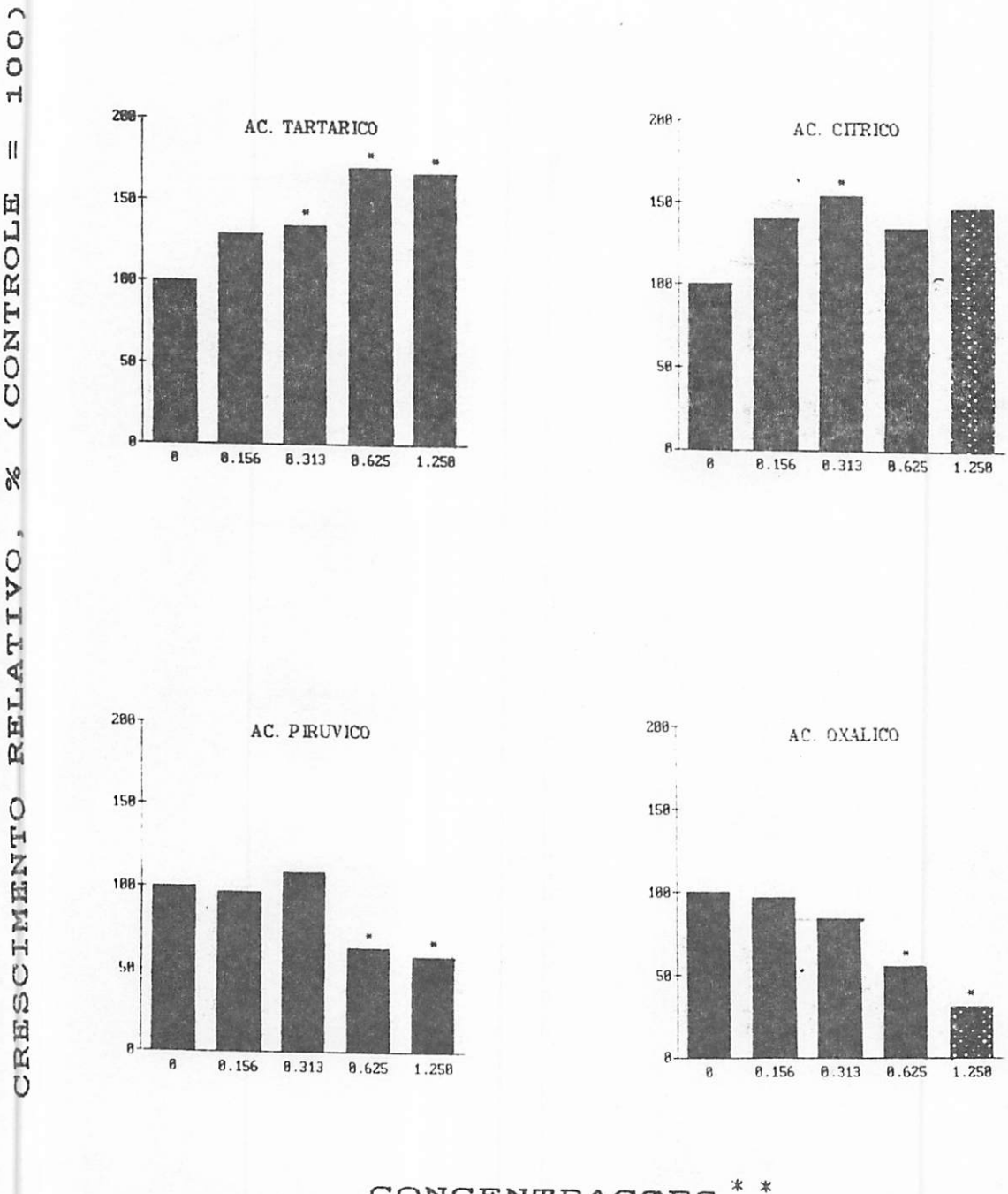


FIGURA 6. Crescimento micelial de G. gigantea em meio nutritivo suplementado com ácidos orgânicos. Média de dois ensaios.

* Médias diferem do controle pelo Teste de Tukey ($P \leq 5\%$).

** Concentrações conforme Quadro 2.

tritivos com os ácidos tartárico e cítrico. Segundo GRIFFIN (1981), os efeitos estimulatórios de ácidos orgânicos podem ser geralmente atribuídos ao seu poder tampão. Portanto, os efeitos estimulatórios obtidos neste estudo poderiam ser o resultado de tal característica destes compostos. Entretanto, a análise do pH final dos meios de cultivo não forneceu evidências claras da existência de possível relação entre crescimento micelial e pH do meio de cultivo (Quadro 6A). Desta forma,não se pode descartar a possibilidade de que estes compostos tenham exercido efeitos diretos sobre o fungo, sendo utilizados com fontes de carbono para a elongação de hifas.

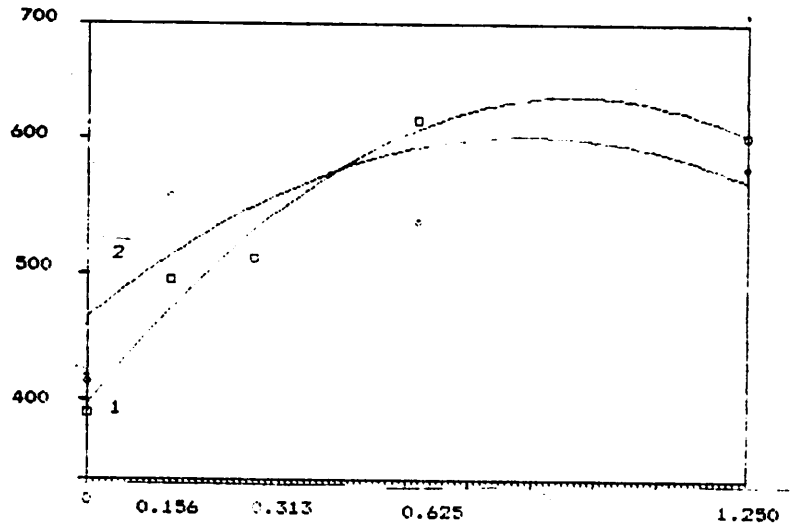
Ocorreu uma acentuada redução no crescimento micelial de G. gigantea com o aumento da concentração dos ácidos pirúvico e oxálico, evidenciando seu efeito inibitório para o desenvolvimento do fungo. Os dados obtidos neste estudo para o ácido pirúvico discordam, contudo, dos relatados por HEPPER (1983b) e por SIQUEIRA *et alii* (1982), os quais não observaram efeitos deste ácido sobre o crescimento de fungos MVA *in vitro*. O fornecimento de ácido pirúvico na forma do sal piruvato de sódio neste estudo, pode ser responsável em parte pelos efeitos inibitórios observados, visto que o sódio, quando íon acompanhante, parece exercer efeito inibitório sobre o crescimento micelial de fungos MVA, conforme verificado por HEPPER (1984a) e por HIRREL (1981). Portanto, a inibição do crescimento micelial de G. gigantea com o aumento da concentração de piruvato de sódio pode ter sido resultante da elevação da disponibilidade

1 □ Ac tartárico $\hat{Y} = 19,44 + 13,25x - 7,18x^2$ $(P \leq 0,005)$

$r^2 = 0,97$

2 ϕ Ac. Cítrico $\hat{Y} = 21,16 + 8,66x - 5,20x^2$ $(P \leq 0,1)$

$r^2 = 0,50$

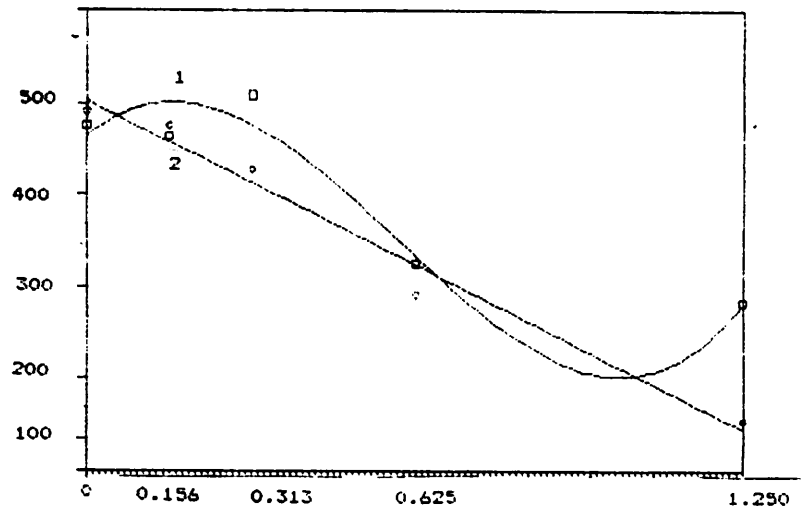


1 □ Ac. Pirúvico $\hat{Y} = 21,92 + 14,45x - 51,36x^2 + 29,05x^3$

$(P \leq 0,01)$ $r^2 = 0,94$

2 ϕ Ac. Oxálico $\hat{Y} = 23,09 - 8,63x$ $(P \leq 0,005)$

$r^2 = 0,98$



CONCENTRAÇÃO, g/l

FIGURA 7. Crescimento micelial de G. gigantea em meio nutritivo suplementado com os ácidos tartárico, cítrico, pirúvico e oxálico. Média de dois ensaios. (Equação de dados transformados por $Y = \sqrt{x + 0,5}$).

de sódio no meio a níveis tóxicos para o desenvolvimento do fungo. Por outro lado, esta espécie é predominante em ecossistemas de dunas, KOSKE (1981a), onde provavelmente prevalessem altos níveis de sódio em solução e seria esperado que este fungo apresentasse uma menor sensibilidade a este íon que outras espécies de fungos MVA.

Nos ensaios conduzidos com ácido oxálico observou-se a formação de um precipitado branco no meio nutritivo ao final do período de incubação, constituído provavelmente de oxalato de cálcio formado pela reação do ácido oxálico com o cálcio fornecido ao meio sob a forma de Ca $(H_2PO_4)_2H_2O$, pois o ácido oxálico é produzido por células vegetais e fungos, e em ambos está relacionado à quelação de íons, principalmente cálcio, LAPEYRIE (1977) e PUNJA & JENKINS (1984).Assim, a forte inibição do crescimento micelial obtida nestes ensaios pode ter sido resultante de efeito direto do ácido oxálico sobre o fungo ou de efeito indireto devido à complexação do cálcio do meio pela formação do precipitado. A baixa disponibilidade de Ca^{++} pode ter prejudicado o processo de elongação das hifas uma vez que este íon é de extrema importância na manutenção de integridade de membranas.

No Quadro 5 são apresentados os resultados do número total de células auxiliares produzidas por G. gigantea em meio suplementado ou não com diferentes concentrações de ácidos orgânicos. Estes resultados evidenciam claras relações entre diminuição do crescimento micelial e produção de células

auxiliares. Entretanto, não foram observadas relações entre aumentos no crescimento micelial e produção dessas estruturas, como relatado anteriormente nos ítens 4.2 e 4.3.

QUADRO 5. Número total de células auxiliares produzidas pelo micélio de G. gigantea em meio nutritivo suplementado com ácidos orgânicos. Média de dois ensaios. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Ácidos Orgânicos	Concentrações g/l				
	0,0	0,156	0,313	0,625	1,250
Ácido tartárico	27	14	11	56	29
Ácido cítrico	25	06	14	03	06
Ácido pirúvico	47	40	36	27	18
Ácido oxálico	30	20	11	12	01

Os efeitos dos ácidos orgânicos sobre o crescimento micelial de G. gigantea foram mais acentuados que os relatados anteriormente para os carboidratos. A suplementação do meio nutritivo com os ácidos tartárico e cítrico resultou em aumentos de 70 e 54% no crescimento do fungo, respectivamente. Por outro lado, inibições de 42% e 69% foram obtidas na presença dos ácidos pirúvico e oxálico, respectivamente. Entretanto, estes efeitos estimulatórios dos ácidos orgânicos são ainda de pequena magnitude quando se considera que a presença de células ou de exsudatos de plantas pode aumentar em até 500% o crescimento micelial de fungos MVA, PAULA (1988).

5. CONCLUSÕES

1. A curva de crescimento micelial de G. gigantea foi semelhante à de outros fungos filamentosos e não foi alterada pela adição de fonte de carbono ao meio nutritivo.

2. Frutose, arabinose, sacarose, manitol e amido não influenciaram significativamente o crescimento do fungo.

3. Efeitos estimulatórios foram obtidos em baixas concentrações de pectina e efeitos inibitórios na presença de trealose, mesmo quando em baixas concentrações.

4. Efeitos estimulatórios da sacarose foram obtidos quando este carboidrato foi adicionado após 10 ou 20 dias de incubação dos esporos pré-germinados em meio nutritivo.

5. Os efeitos de ácidos orgânicos sobre o crescimento micelial foram acentuados, sendo estímulo de 70 e 54% obtido para os ácidos tartárico e cítrico e inibição de 42 e 69% para os ácidos pirúvico e oxálico, respectivamente.

6. Nenhum dos compostos orgânicos estudados sustentou a produção em massa de micélio de G. gigantea *in vitro*, na ausência de raízes vivas.

6. RESUMO

Efeitos de compostos orgânicos sobre o crescimento micelial de Gigaspora gigantea in vitro.

L. R. C. da Silva

Os efeitos benéficos dos fungos micorrízicos vesículo - arbusculares (MVA) na nutrição mineral e desenvolvimento das plantas hospedeiras são inquestionáveis. Porém, o seu emprego em larga escala é ainda restrito devido às dificuldades encontradas na produção de inóculo, pois os fungos MVA são biotróficos obrigatórios e ainda não foram cultivados em laboratório. A transposição da barreira imposta pelo biotrofismo depende, portanto, da determinação de seus requerimentos nutricionais para que sejam elaborados meios de cultivo capazes de sustentar o seu crescimento micelial *in vitro*. Neste sentido, conduziu-se o presente estudo com o objetivo de caracterizar o crescimento micelial do fungo MVA Gipaspora gigantea, estabelecer sua curva de crescimento e determinar os efeitos de carboidratos e de ácidos orgânicos sobre seu crescimento micelial *in vitro*.

Na primeira etapa, esporos pré-germinados e assépticos foram incubados por períodos variados em meio nutritivo líquido suplementado ou não com sacarose para determinação das curvas de crescimento micelial na presença e na ausência de carbono.

Posteriormente, estudaram-se os efeitos de diferentes concentrações dos carboidratos glicose, frutose, arabinose, sacarose, trealose, manitol, amido e pectina e dos ácidos pirúvico, cítrico, oxálico e tartárico sobre o crescimento micelial. Estudaram-se, ainda, os efeitos de períodos de pré-crescimento no meio nutritivo sobre a utilização subsequente de sacarose. Ao final dos períodos de incubação, os esporos foram observados sob microscópio estereoscópico para avaliação das características morfológicas do micélio formado. O crescimento micelial foi avaliado por método de interseção de hifas modificado de HEPPER & JAKOBSEN (1983).

A curva de crescimento micelial de G. gigantea foi semelhante à de outros fungos filamentosos, não sendo alterada pela disponibilidade de carbono no meio. Para os carboidratos, efeitos estimulatórios foram obtidos em baixas concentrações de pectina e inibitórios para trealose, mesmo em baixas concentrações. Efeitos estimulatórios de sacarose foram obtidos quando este carboidrato foi adicionado após 10 ou 20 dias de incubação dos esporos em meio nutritivo. Os ácidos orgânicos exerceram efeitos mais acentuados sobre o crescimento, ocorrendo estímulo de 70 e 54% para os ácidos tartárico e cítrico e inibição de 42 e 69% para os ácidos pirúvico e oxálico, respectivamente. Os compostos orgânicos não provocaram modificações na morfologia das hifas, porém, observou-se uma tendência de relação de proporcionalidade entre crescimento micelial e número de células auxiliares produzidas.

7. SUMMARY

Effects of organic compounds on the mycelial growth of Gigaspora gigantea in vitro .

L. R. C. da Silva

The beneficial effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (VAM) on plant mineral nutrition and development are well known. However, their application in large scale is still restricted because of the difficulties found in inoculum production, for the VAM fungi are obligate biotrophs and have not been cultured in laboratory yet. The difficulties imposed by the biotrophisn will only be overcome when their nutritional requeriments are determined and culture media able to support their mycelial growth *in vitro* developed. Therefore, the present study was undertaken to characterize the mycelial growth of the VAM fungus Gigaspora gigantea, establish its growth curve, and determine the effects of carbohydrates and organic acids on its mycelial growth *in vitro*.

In the first part of the study, asseptic pre-germinated spores were incubated for various periods of time in a liquid nutrient medium, suplemented or not with sucrose in order to determine the mycelial growth curves in the presence and absence of carbon. Latter, the effects of different

concentrations of the carbohydrates glucose, fructose, arabinose, sucrose, trealose, mannitol, starch and pectin and of piruvic, citric, oxalic and tartaric acids on the mycelial growth of the fungus were studied. The effects of different periods of pre-growth in nutrient medium on the subsequent response to sucrose were also studied. In the end of the incubation periods, the spores were observed under dissecting microscope to determine the morphological features of the mycelium formed. The mycelial growth was assessed by a hyphal intersection method modified from HEPPER & JAKOBSEN (1983).

The mycelial growth curve of G. gigantea was similar to that of other filamentous fungi and was not affected by the carbon availability in the medium. For the carbohydrates, stimulatory effects were obtained in low concentrations of pectin and inhibition in low and high concentrations of trealose. Stimulatory effects for sucrose were obtained when this carbohydrate was added after 10 or 20 days of incubation of the spores in the nutrient medium. The organic acids had marked effects on growth: 70 and 54% stimulation was obtained for the tartaric and citric acids, and 42 and 69% inhibition for the piruvic and oxalic acids, respectively. The organic compounds did not cause any changes in hyphal morphology; however, a tendency for a relation of proportionality between mycelial growth and number of auxiliary cells formed was observed.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. BARTNICKI-GARCIA & LIPPMAN, E. The bursting tendency of hyphal tips of fungi: presumptive evidence for a delicate balance between wall synthesis and wall lysis in apical growth. Journal of General Microbiology, Colchester, 73: 487-500, 1972.

02. BEILBY, J. P. Effects of inhibitors on early protein, RNA, and lipid synthesis in germinating vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores of Glomus caledonium. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 29:596-601, 1983.

03. --------.Fatty acids and sterol composition of ungerminated spores of the vesicular - arbuscular mycorrhizal fungus, Acaulospora laevis. Lipids, Champaign, 15:949-52, 1980.

04. -------- & KIDBY, D. K. Biochemistry of ungerminated and germinated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, Glomus caledonius: changes in neutral and polar lipids. Journal of Lipid Research, Bethesda, 21:739-50, 1980a.

05. BEILBY, J. P. & KIDBY, D. K. The early synthesis of RNA, protein, and some associated metabolic events in germinating vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores of Glomus caledonius. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 28:263-28, 1982.

06. -------- & ---------. Sterol composition of ungerminated and germinated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, Glomus caledonium. Lipids, Champaign, 15(5):375-78, 1980b.

07. BERRY, D. R. The environmental control of the physiology of filamentous fungi. In: SMITH, J. E. & BERRY, D. R., ed. The filamentous fungi. New york, Wiley & Sons, 1975. cap.2, p.16-32.

08. BEVEGE, D. I.; BOWEN, G. D. & SKINNER, M. F. Comparative carbohydrate physiology of ecto and endomycorrhizas. In: SANDERS, E. E.;MOSSE, B. & TINKER, P. B. eds. Endomycorrhizas. London, Academic Press, 1975. p. 149-74.

09. BONFANTE-FASOLO, P.;BERTA, G. & FUSCONI,A. Distribution of nuclei in a VAM fungus during its symbiotic phase. Transactions of the British Mycological Society, London, 88(2):263-66, Mar. 1987.

10. BONFANTE-FASOLO, P.;DEXHEIMER, J.;GIANINAZZI,S.;GIANINAZZI-PERASON, V. & SCANNERINI, S. Cytochemical modifications in the hostfungus interface during intracellular interactions in vesicular-arbuscular mycorrhizae. Plant Science Letters, Limerick, 22(1):13-21, July 1981.

11. BOONSAENG, V.; SULLIVAN, P. A. & SHEPHERD, M. G. Mannitol production in fungi during glucose catabolism. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa,22(6):808-16, Jan. 1976.

12. BURGGRAAF, A.J.P. & BERINGER, J. E. Absence of nuclear DNA synthesis in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi during *in vitro* development. The New Phytololgist, Cambrige, 111 (1): 25-33, Jan. 1989.

13. BUWALDA,J.G. & GOH,K.M. Host-fungus competition for carbon as a cause of growth depressions in vesicular-arbuscular mycorrizal ryegrass. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 14:103-06, 1982.

14. CAPACCIO,L.C.M. & CALLOW,J.A. The enzymes of polyphosphate metabolism in vesicular-arbuscular mycorrzihas, The New Phytologist, Cambridge, 91:81-91, 1982.

15. CARR, G. R.; HINKLEY, M. A.; Le TACON, F.; HEPPER, C. M.; JONES, M.G.K. & THOMAS,E. Improved hyphal growth of two species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of suspension - cultured plant cells. The New Phytologist, Cambridge, 101:417-26, 1985.

16 COLOZZI FILHO, A Desinfestação superficial de esporos de fungos micorrízicos vesiculo-arbusculares. Lavras,ESAL, 1988. 80p. (Tese MS).

17. COOPER, K M. & LÖSEL, D. Lipid physiology of vesicular-arbuscular mycorrhiza. I.Composition of lipids in roots of onion, clover and ryegrass infected with Glomus mosseae. The New Phytologist, Cambridge, 80:143-51, 1978.

18. COX,G.;SANDERS,F.E.;TINKER,P.B. & WILD,J.A. Ultrastructural evidence relating to host-endophyte transfer in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. In: SANDERS, F. E.; MOSSE, B & TINKER,P.B. eds. Endomycorrhizas. London, Academic Press,1975. p.297-312.

19. -------- & TINKER, P. B. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. I. The arbuscule and phosphorus transfer:a quantitative ultrastructural study. The New Phytologist, Cambridge,77:371-78, 1976.

20 DANIELS, B.A & GRAHAM, S.O. Effects of nutrition and soil extracts on germination of Glomus mosseae spores. Mycologia, New York, 68(1):108-16, Jan./Fev. 1976.

21. -------- & MENGE, J. A. Secondary sporocarps formation by Glomus epigalus, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, in long-term storage. Mycologia, New York, 72:1235-8, 1980.

22. DANIELS, B. A. & TRAPPE, J. M. Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Glomus epigaeous. Mycologia, New York, 72(3):457-71, May/June 1980.

23. ELIAS, K. S. & SAFIR, G. R. Hyphal elongation of Glomus fasciculatus in response to root exsudates. Applied and Environmental Microbiology, New York, 53(8):1928-33, Aug. 1987.

24. GARRAWAY,M.O. & EVANS,R. Fungal nutrition and physiology, New York, John wiley & Sons, 1984. 401 p.

25. GERDEMANN, J. W. Relation of a large soil-borne spore to mycorrhizal infection. Mycologia, New York, 47(5):619-32, Sept./Oct. 1955.

26. --------. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, 6:397-418, 1968.

27. -------- & NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society, London, 46(2):235-44, 1963.

28. GIANINAZZI,S.;DEXHEIMER, J.;GIANINAZZI-PEARSON,V. & MARX,C. Role of the host-arbuscule interface in the VA mycorrhizal symbiosis; Ultracytological studies of process involved in phosphate and carbohydrate exchange. Plant and soil, The Hague, 71(1/3):211-5, 1983.

29. GIANINAZZI-PEARSON, V.;MORANDI,D.;DEXHEIMER,J.& GIANINAZZI, S. Ultrastructural and ultracytochemical features of a Glomus tenuis mycorrhiza. The New Phytologist, Cambridge. 88:633-9, 1981.

30. GODFREY, R.M. Studies on British species of Endogone: III- Germination of spores. Transactions of the British Mycological Society, London, 40(2):203-10, 1957.

31. GRAHAM, J.H. Effect of citrus root exudates on germination of chlamydospores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, Glomus epigaeum. Mycologia, New York, 74(5):831-5, Sept./Oct. 1982.

32. GRIFFIN, D. H. Fungal Physiology. New York, John Wiley & Sons, 1981. 383 p.

33. HARDIE, K. Germination of Glomus mosseae spores isolated from stock pots of different ages. Transactions of the British Mycological Society, London, 83(4):693-96, Dec. 1984.

34. HAYMAN,D.S. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. IV. Effect of light and temperature. The New Phytologist, Cambridge, 73:71-80, 1974.

35. HEPPER, C.M. Effect of phosphate on germination and growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Transactions of the British Mycological Society, London, 80(3):487-90,June 1983a.

36. HEPPER, C. M. Germination and growth of Glomus caledonium spores: the effects of inhibitors and nutrients. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 11:269-77, 1979.

37. --------. Inorganic sulphur nutrition of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Glomus caledonium. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 16(6):669-71, 1984a.

38. --------. Isolation and culture of VA mycorrhizal (VAM) fungi. In:POWELL,C.L. & BAGYARAJ,D.J.,ed. VA mycorrhiza, Boca Raton, CRB Press, 1984b. p.95-111.

39. --------. Limited independent growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*. The New Phytologist, Cambridge, 93(4):537-42, Abr. 1983b.

40. --------. VAM spore germination and hyphal growth *in vitro*-prospects for axenic culture. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 7, Gainesville, 1987. Proceedings... Gainesville, IFAS, 1987. p.172-74.

41. -------- & JAKOBSEN, I. Hyphal growth from spores of the mycorrhizal fungus Glomus caledonium: effect of amino acids, Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 15(1):55-58, 1983.

42. -------- & SMITH, G. A. Observations on the germination of Endogone spores. Transactions of the British Mycological Society, London, 66(2):189-94, Abr. 1976.

43. HIRREL,M.C. The effect of sodium and chloride salts on the germanation of Gigaspora margarita. Mycologia, New York, 73(4):610-7, July/Ago. 1981.

[redacted]

44. JABAJI-HARE, S.; DESCHENE, A. & KENDRICK, B. Lipid content and composition of vesicles of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. Mycologia, New York, 76(6):1024-30, Nov./Dec. 1984.

45. --------;PICHE, Y. & FORTIN, J.A. Isolation and structural characterization of soil-borne auxiliary cells of Gigaspora margarita, Becker & Hall, a vesicular-arbuscular fungus. The New Phytologist, Cambridge, 103(4):777-84, Aug. 1986.

46. KOCH, K. E. & JOHNSON, C. R. Photosynthate partitioning in split-root citrus seedlings with mycorrhizal and non-mycorrhizal root systems. Plant Physiology, Rockville, 75 (1):26-30, May. 1984.

47. KOSKE, R. E. Evidence for a volatile attractant from plant roots affecting germ tubes of a VA mycorrhizal fungus. Transactions of the British Mycological Society, London, 79(2):305-10, Oct. 1982.

48. ---------. Gigaspora gigantea: observations on spore germination of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. Mycologia, New York, 73(2):288-300, Mar./Apr. 1981a.

49. ---------. Multiple germination by spores of Gigaspora gigantea Transactions of the British Mycological Society, London, 76(2):328-30, 1981b.

50. LAPEYRIE, F. Oxalic acid synthesis by a mycorrhizal fungus in calcareus soil. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 7, Gainesville, 1987.. Proceedings... Gainesville, IFAS, 1987. p.203.

51. LE TACON,F.;SKINNER,F.A. & MOSSE, B. Spore germination and hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Glomus mosseae (Gerdemann & Trappe), under decreased oxygen and increased carbon dioxide concentrations. Canadian Journal of Microbiology,Ottawa, 29:1280-85, 1983.

52. LEHNINGER, A. L. Princípios de bioquímica. São Paulo, SARVIER, 1984. 725p.

53. LEWIS, D. H. Micro-organisms and plants: the evolution of parasitism and mutualism. In: SYMPOSIUM OF THE SOCIETY OF GENERAL MICROBIOLOGY, 24, Cambridge, Cambridge University Press, 1974. p.367-92.

54. LOPES, E. S.; SIQUEIRA, J.O. & ZAMBOLIM, L. Caracterização das micorrizas vesicular-arbuscular (MVA) e seus efeitos no crescimento das plantas. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 7(1):1-19, Jan./Abr. 1983.

55. LOUIS, I. & LIM, G. Observations on *in vitro* sporulation of Glomus clarum. Transactions of the British Mycological Society, London, 91(4):698-9, Dec. 1988.

56. MAcDONALD, R. M. & LEWIS, M. The occurrence of some acid phosphatases and dehydrogenases in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Glomus mosseae.The New Phytologist, Cambridge, 80:135-41, 1978.

57. MARX, C.;DEXHEIMER,J.;GIANINAZZI-PEARSON,V. & GIANINAZZI,S. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. IV. Ultracytoenzymological evidende (ATPase) for active transfer processes in the host arbuscule interface. The New Phytologist, Cambridge, 90: 37-43, 1982.

58. MASKALL, C. S. Biochemical studies of the VA endophyte. Reports of the Rothamsted Experimental Station, Harpenden, (pt.1):204-5, 1980.

59. MOSSE, B. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhizae. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, 11:171-96, 1973.

60. --------.The regular germination of resting spores and some observations on the growth requeriments of an Endogone sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiza.Transactions of the British Mycological Society, London, 42:273-86, 1959.

61. -------- & HEPPER, C. M. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. Physiological Plant Pathology, London, 5:215-23, 1975.

62. NADARAJAH, P. & NAWAWI, A. Effect of temperature on germination and growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 7, Gainesville, 1987. Proceedings... Gainesville, IFAS, 1987. p.214.

63. NAGY, S.;NORDBY, H.E. & NEMEC, S. Composition of lipids in rooté of six citrus cultivars infected with the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, Glomus mosseae. The New Phytologist, Cambridge, 85(3):377-84, 1980.

64. NEMEC,S. Histochemical characteristics of Glomus etunicatus infection of citrus limon fibrous roots. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 59(5):609-17, May. 1981.

65. PACOVSKY, R. S. Metabolic differences in Zea - Glomus - Azospirillum symbioses. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 21(7):953-60, 1989.

66. -------- & FULLER, G. Mineral and lipid composition of Glycine - Glomus - Bradyrhizobium symbioses. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 72:733-46, 1988.

67. PARK, D. & ROBINSON, F.M. Internal pressure of hyphal tips of fungi and its significance in morphogenesis.Annals of Botany, London, 30(119):425-40, 1966.

68. PAULA, M. A. Germinação e crescimento micelial de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares na presença de calos e suspensão de células. Lavras, ESAL, 1988. 128 p. (Tese MS).

69. PONS,F. & GIANINAZZI-PEARSON,V. Influence du phosphore, du potassium, de l'azote et du pH sur le comportement *in vitro* de champignons endomycorhizogenes a vésicules et arbuscules. Cryptogamie Mycologie,Paris, 5:87-100, 1984.

70. PONS, S.; MUDGE, K. W. & NEGM, F. B. Effect of mannitol on the *in vitro* growth, temperature optimum, and subsequent ectomycorrhizal infectivity of Pisolithus tinctorius. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 64(9):1812-6, Sept. 1986.

71. PUNJA, Z.K. & JENKINS, S.F. Influence of medium composition on mycelial growth and oxalic acid production in Sclerotium rolfsii. Mycologia, New York, 76(5):947-50, Sept./Oct. 1984.

72. READ, D. J. Development and function of mycorrhizal hyphae in soil. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 7, Gainesville, 1987. Proceedings... Gainesville, IFAS, 1987. P. 178-80.

73. -------- & STRIBLEY, D. P. Diffusion and translocation in some fungal culture systems. Transactions of the British Mycological Society, London, 64(3):381-8, Jan. 1975.

74. SCHENCK, N.C.; GRAHAM, S.O. & GREEN, N. E. Temperature and light effect on contamination and spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycologia, New York, 67:1189-92, 1975.

75. SILVA, L.R.C.; PEREIRA,J. & AZEVEDO, I.C. Efeito de fontes de fósforo sobre o crescimento micelial de Gigaspora gigantea *in vitro*. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS,3, Piracicaba, 1989. Anais... Piracicaba, CENA/ESALQ, 1989. p. 78.

76. SIQUEIRA, J.O. Micorrizas: forma e função. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1, Lavras, 1985. Anais... Lavras, ESAL/FAEPE/CAPES, 1986. p.5-32.

77. -------- & HUBBELL, D. H. Effect of organic substrates on germination and germ tube growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus spores *in vitro*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 21(5):523-7, 1986.

78. --------; -------- & MAHMUD, A. W. Effects of liming on spore germination, germ tube growth and root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil, The Hague, 76(1-3):115-24, 1984.

79. --------; -------- & SCHENCK, N.C. Germination and germ tube growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*. Mycologia, New York, 74(60:952-59, Nov./Dec. 1982.

80. --------; SYLVIA, D. M.; GIBSON, J. & HUBBELL, D.H. Spores, germination, and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 31(11):965-70, Nov. 1985.

81. THOMSON, B. D.; ROBSON, A. D. & ABBOTT, L. K. Effects of phosphorus on the formation of mycorrhizas by Gigaspora calospora and Glomus fasciculatum in relation to root carbohydrates. The New Phytologist, Cambridge, 103(4): 751-65, Aug. 1986.

82. TOMMERUP, I. C. Effect of soil water potencial on spore germination by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Transactions of the British Mycological Society, London, 83(2):193-202, Sept. 1984.

83. TOMMERUP, I. C. Inhibition of spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. Transaction of the British Mycological Society, London, 85(2):267-78, 1985.

84. --------. Spore dormancy in vesicular - arbuscular mycorrhizal fungi. Transactions of the British Mycological Society, London, 81(1):37-45, 1983.

85. TRINCI, A. P. J. A study of the kinetic of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. Journal of General Microbiology, Colchester, 81:225-36, 1974.

86. WALKER, C. & SANDERS, F. E. Taxonomic concepts in the Endogonaceae. III. The separation of Scutellospora gen. nov. from Gigaspora Gerd. & Trappe. Mycotaxon, 27:169-82, 1986.

87. WARTRUD, L.S.;HEITHAUS, J.J. & JAWORSKI, E.G. Evidence for production of inhibitor by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Gigaspora margarita. Mycologia, New York, 70(4):821-8, July/Aug. 1978a.

88. --------;-------- & --------Geotropism in the endomycorrhizal fungus Gigaspora margarita. Mycologia, New York. 70(2):449-52, Mar./Apr. 1978b.

APÊNDICE

QUADRO 1A. Resumo da análise de variância da curva de crescimento micelial de G. gigantea em meio nutritivo. ESAL, Lavras -MG, 1990.

Componente de Variância	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Nível de Significância (%)	r^2	Coeficiente de variação
Período de incubação	(5)	123,0175	0,006	-	7,75
Regressão linear	1	254,7295	0,500	0,41	-
Regressão quadrática	1	296,2239	0,500	0,90	-
Desvio de regressão	3	64,1342	-	-	-

QUADRO 2A. Resumo das análises de variância das curvas de crescimento micelial de G. gigantea em meio nutritivo com e sem adição de sacarose. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Componente de Variância	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Nível de Significância (%)	r^2	Coeficiente de variação (%)
Com sacarose	(6)	173,2720	0,00	-	6,45
Regressão linear	1	743,9623	0,50	0,74	-
Regressão quadrática	1	194,0993	0,50	0,95	-
Desvio de regressão	4	101,5706	-	-	-
Sem sacarose	(6)	174,2850	0,00	-	8,12
Regressão linear	1	772,1798	0,50	0,72	-
Regressão quadrática	1	218,1873	0,50	0,90	-
Desvio de regressão	(4)	55,3431	-	-	-

QUADRO 3A. Resumo das análises de variância do crescimento micelial de G. gigantea em meio nutritivo suplementado com carboidratos. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Componente de Variância	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Nível de Significância (%)	r^2	Coeficiente de variação (%)
Glicose	(4)	5,7821	1,30	-	4,57
Regressão linear	1	5,6271	5,00	0,24	-
Desvio de Regressão	3	8,7507	-	-	-
Pectina	(4)	6,8740	0,10	-	3,15
Regressão linear	1	8,3734	0,50	0,30	-
Regressão quadrática	1	7,3498	1,00	0,57	-
Regressão cúbica	1	6,1741	1,00	0,80	-
Desvio de Regressão	1	5,5985	-	-	-
Trealose	(4)	11,4360	1,45	-	5,70
Regressão linear	1	30,1025	0,50	0,66	-
Regressão quadrática	1	9,4176	10,00	0,86	-
Desvio de regressão	2	3,1119	-	-	-
Frutose	(4)	4,7119	30,72	-	8,61
Arabinose	(4)	6,9182	14,56	-	8,60
Manitol	(4)	2,6383	13,50	-	5,36
Sacarose	(4)	6,2358	7,22	-	6,51
Amido	(4)	4,2809	16,37	-	6,01

QUADRO 4A. Análise de variância do crescimento micelial de G. gigantea em meio nutrivo com sacarose após períodos de pré-crescimento na ausência de fontes de carbono. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Componente de Variância	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível de Significância
Tratamento	2	41,95234680	20,976173400	14,395	0,1570
Erro	9	13,11463642	1,457181811		
Total	11	55,06698608			

C.V. = 6,49%

QUADRO 5A. Resumo das análises de variância do crescimento micelial de *G. gigantea* em meio nutritivo suplementado com ácidos orgânicos. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Componente de Variância	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Nível de Significância (%)	r^2	Coeficiente de variação (%)
Ácido tartárico	(4)	16,8782	0,090	-	5,29
Regressão linear	1	46,8170	0,500	0,70	-
Regressão quadrática	1	18,5817	0,500	0,97	-
Desvio de Regressão	2	1,0570	-	-	-
Ácido cítrico	(4)	10,4931	2,940	-	6,83
Regressão linear	1	11,2283	10,000	0,27	-
Regressão quadrática	1	9,7484	10,000	0,50	-
Regressão cúbica	1	20,9656	2,500	0,99	-
Desvio de Regressão	1	0,0301	-	-	-
Ácido pirúvico	(4)	27,3475	0,020	-	6,28
Regressão linear	1	85,8101	0,500	0,78	-
Regressão quadrática	1	0,2155	NS	0,79	-
Regressão cúbica	1	16,5513	1,000	0,94	-
Desvio de regressão	1	8,4067	-	-	-
Ácido oxálico	(4)	55,7621	0,004	-	8,03
Regressão linear	1	218,2522	0,500	0,98	-
Desvio de regressão	3	2,3992	-	-	-

QUADRO 6A. Valores de pH final do meio nutritivo suplementado com compostos orgânicos. Média de dois ensaios.

Compostos Orgânicos	Concentrações*				
	0	1	2	3	4
Glicose	5,53	5,77	5,94	5,26	5,52
Pectina	6,86	6,36	5,67	5,73	5,62
Trealose	6,69	6,57	6,63	6,52	6,33
Frutose	6,36	6,30	6,12	5,85	5,65
Arabinose	5,49	4,86	4,77	4,82	5,13
Manitol	5,23	5,44	5,51	5,73	6,24
Sacarose	5,96	5,87	5,67	5,83	5,77
Amido	6,09	6,31	6,06	6,27	5,91
Ácido tartárico	5,02	5,31	5,18	5,23	5,16
Ácido cítrico	6,17	6,01	5,98	6,09	5,85
Ácido pirúvico	5,76	7,02	6,94	6,80	6,82
Ácido oxálico	5,92	5,55	5,88	5,54	5,19

* As concentrações 0, 1, 2, 3 e 4 correspondem à 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 g/l para carboidratos e à 0,0; 0,156; 0,313; 0,625 e 1,250 g/l para ácidos orgânicos e pectina.